



**Doctorat Université Libanaise**

**THESE EN COTUTELLE**

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

**L'Université de Lille**

Spécialité: Bactériologie – virologie, hygiène hospitalière

**et**

**L'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie**

**(Université Libanaise)**

Spécialité: Microbiologie alimentaire et médicale

Présentée et soutenue publiquement par

**Mazen Zaylaa**

**Le 23 novembre 2018**

**Probiotique et autophagie : exploration de l'impact possible sur la  
maladie de Crohn**

Directeur de thèse Français: **Pr. Bruno Pot**

Directeur de thèse Libanais: **Pr. Fouad Dabboussi**

**Membres du Jury**

**Dr. Muriel Thomas**, INRA, France

**Pr. Nassim Farès**, Université Saint Joseph, Liban

**Dr. Pierre Lapaquette**, Université de Bourgogne, France

**Dr. Mira Chaar**, Université Balamand, Liban

**Dr. Corinne Grangette**, Université de Lille, France

**Dr. Imad Al Kassaa**, Université Libanaise, Liban

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Co-directeur

Co-directeur

## **REMERCIEMENTS**

En préambule, je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude à toutes les personnes qui m'ont apporté de l'aide pour élaborer ce projet ainsi qu'aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier les trois sources de financement qui ont soutenu la réalisation de ce projet de thèse, je cite d'abord l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) et la Direction Régionale de Moyen-Orient (DRMO) qui ont financé mon séjour en France. Je remercie aussi l'Université de Lille qui m'a apporté un complément de bourse lors de mon premier séjour en France (bourse de mobilité CABRI) et enfin l'Association Libanaise pour le développement de la recherche (LASER) pour leur soutien financier lors de mes séjours au Liban.

Je tiens à remercier les membres du jury, d'avoir accepté de lire et d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie très sincèrement le Docteur **Muriel THOMAS** et le Professeur **Nassim FARES** d'avoir accepté d'être rapporteur. Je remercie de même les Docteurs **Mira CHAAR** et **Pierre LAPAQUETTE** d'avoir accepté d'examiner le contenu de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse et ancien responsable de l'équipe BLIM, le **Pr. Bruno POT** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée.

Je voudrais tout particulièrement adresser mes grands remerciements à ma co-directrice de thèse, le **Dr. Corinne GRANGETTE**, pour son encadrement scientifique, ses nombreuses explications, son aide, sa patience et sa grande sympathie ainsi que pour le temps qu'elle m'a consacré à réaliser ce projet. Merci pour ta patience et pour ton accompagnement dans mes premiers pas au laboratoire et tout au long de ce projet. Les connaissances, le savoir-faire et les conseils que tu m'as transmis sont et resteront très précieux pour moi.

Pour le côté libanais, Je tiens également à remercier le directeur de l'équipe LMSE à l'Université Libanaise, le **Pr. Monzer HAMZE**, de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire. Les conseils scientifiques et humains que vous m'avez transmis sont et resteront précieux pour moi.

Un grand merci pour mon directeur de thèse libanais, le **Dr. Fouad DABBOUSSI** pour m'avoir accueilli il y a 5 ans lors de mon Master Recherche et m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez attribuée. Je tiens également

à vous exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Je tiens à présenter mes plus chaleureux remerciements au **Dr. Imad AL KASSAA**, co-directeur de thèse libanais. J'ai énormément appris à ton contact, que ce soit d'un point de vue scientifique, technique ou humain. Tu as su me faire partager ta passion de la recherche et de la « bonne science ». Vos conseils et votre soutien scientifique et moral ont été une grande aide pour moi. Pour tout cela et tout le reste, un grand merci.

Je voudrais également remercier mes plus proches collègues, docteurs ou futurs docteurs **Juliano Haddad, Ranin Beshara** et **Hussein el zein** pour votre soutien et vos encouragements tout au long de mon travail et au cours de mes voyages.

Je tiens aussi à remercier de tout mon cœur les membres de l'équipe BLIM. Merci beaucoup à **Jeanne, Denise, Véronique, Jérémy** et **Jérôme** pour toutes les journées passées à l'animalerie, pour leur aide et surtout de m'avoir supporté. Merci pour votre amitié.

Je tiens également à remercier **Dr. Josef Awada, Dr. Wassim Rafei, Dr. Haytham Mobayed, Dr. Ahmad Dhaybi, Dr. Amal Melhem** et **Dr. Bacem Akiki** ... Ainsi que les membres du laboratoire LMSE, du laboratoire de l'Hôpital Nini et du laboratoire de l'Hôpital Monla de Tripoli.

De tout cœur, j'adresse toute mon affection à ma famille, à mon frère **Moemen**, ma sœur **Rim**, ma mère **Hanadi** et mon père **Khaled**. Ces quelques lignes ne sont pas suffisantes pour vous exprimer ma profonde reconnaissance. Malgré mon éloignement durant mon séjour en France, vous étiez toujours là pour moi. Merci pour la motivation et le soutien que vous m'avez apportés pour dépasser les moments difficiles et aller jusqu'au bout. J'espère être toujours à la hauteur de vos attentes.

Enfin un grand merci à tous ceux qui ne sont pas cités ici (au bout de trois ans la liste serait malheureusement trop longue), mais je ne vous oublie pas pour autant.

## **Cadre de travail**

### **- Laboratoires**

Mon travail a été effectué au sein de deux laboratoires d'accueil, le premier à l'Institut Pasteur de Lille - Centre d'infection et d'immunité de Lille - dirigé par le Dr. Camille Locht. Plus précisément, mon projet a été réalisé au sein de l'équipe BLIM : « Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses » sous la direction du Pr Bruno Pot et et la co-direction du Dr. Corinne Grangette qui dirige le laboratoire depuis 2016. Au liban, mon projet s'est poursuivi au sein du laboratoire de Microbiologie, Santé et Environnement (LMSE), dirigé par le Dr. Monzer HAMZE qui est affilié à l'école doctorale des Sciences et technologies, Faculté de Santé Publique, Université Libanaise.

### **-Financement**

Ce projet a été financé par une bourse doctorale principale accordée par l'association l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) ainsi qu'une bourse complémentaire de LASER (Association Libanaise pour Soutenir la Recherche Scientifique) pour mon séjour au Liban et un soutien complémentaire pour la première année de thèse accordé par l'Université de Lille (CABRI). Le projet a été financé par le soutien financier de l'Inserm, du CNRS, de l'Université de Lille, de l'Institut Pasteur de Lille, de l'Agence Nationale de la Recherche et l'Université Libanaise.

## ***LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS***

### ***Publication acceptée***

Mazen Zaylaa, Imad Al Kassaa, Jeanne Alard, Veronique Peucelle, Denise Boutillier, Jérémy Desramaut, Fouad Dabboussi, Bruno Pot and Corinne Grangette. 2018. Probiotics in IBD: Combining in vitro and in vivo models for selecting strains with both anti-inflammatory potential as well as a capacity to restore the gut epithelial barrier. *Journal of Functional Foods*. 47: 304-315.

***Publication en préparation*** pour soumission à *Cellular Physiology and Biochemistry*  
Mazen Zaylaa, Jeanne Alard, Imad Al Kassaa, Veronique Peucelle, Denise Boutillier, Jérémy Desramaut, Fouad Dabboussi, Bruno Pot and Corinne Grangette. *In vitro* and *in vivo* blocking of autophagy abolished the anti-inflammatory capacities of selected probiotic strains.

### ***Communications orales***

Mazen Zaylaa. Probiotiques et Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : sélection des souches probiotiques et l'impact de l'autophagie. Ma thèse en 180 secondes, Journée des doctorants du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Mai 2018.

Mazen Zaylaa. Probiotique et autophagie : exploration de l'impact possible sur la maladie de crohn. Journée des doctorants (Forum doctoral). Université Libanaise, Septembre 2018.

### ***Communications affichées***

Mazen Zaylaa, Jeanne Alard, Veronique Peucelle, Denise Boutillier, Fouad Dabboussi, Bruno Pot and Corinne Grangette. Probiotics in IBD: combining *in vitro* and *in vivo* models to select strains able to exhibit both anti-inflammatory potential and capacity to restore the gut epithelial barrier. Colloque annuel des Doctorants de l'Université de Lille - Journée André Verbert, Septembre 2017.

Mazen Zaylaa, Jeanne Alard, Veronique Peucelle, Denise Boutillier, Imad Al Kassaa, Fouad Dabboussi, Bruno Pot and Corinne Grangette. Probiotics in IBD: combining *in vitro* and *in vivo* models for selecting strains with both anti-inflammatory potential and capacity to restore the gut epithelial barrier. 21ème colloque du Club des bactéries lactiques, Lille, juin 2017.

Corinne Grangette, Mazen Zaylaa, Jeanne Alard, Imad Al Kassaa, Veronique Peucelle, Denise Boutillier, Jeremy Desramaut, Fouad Dabboussi and Bruno Pot. *In vitro* and *in vivo* blockade of autophagy abolished the anti-inflammatory capacities of selected probiotic strains, Porto October 2018.

# SOMMAIRE

<i>REMERCIEMENTS</i> .....	1
<i>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</i> .....	4
<i>SOMMAIRE</i> .....	5
<i>RESUME</i> .....	9
<i>ABSTRACT</i> .....	11
<i>LISTE DES FIGURES</i> .....	13
<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i> .....	14
<i>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</i> .....	18
Chapitre 1 : Le système immunitaire du tube digestif .....	19
1.1. Structure du tube digestif .....	19
1.2. Anatomie et fonction de l'intestin.....	19
1.3. Perméabilité de l'épithélium intestinal .....	22
1.3.1. L'occludine.....	23
1.3.2. Les claudines.....	24
1.3.3. Les protéines ZO (zonula occludens).....	24
1.4. Le système lymphoïde associé à l'intestin .....	25
1.5. Le système immunitaire intestinal .....	26
1.5.1. Immunité innée .....	27
1.5.2. Immunité adaptative .....	35
Chapitre 2 : Les maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICIs) .....	38
2.1. Généralités .....	38
2.2. Epidémiologie des MICIs .....	38
2.3. Diagnostique et symptômes.....	39
2.4. Recommandations thérapeutiques des MICIs .....	41
2.5. Facteurs influençant l'apparition des MICI .....	43
2.5.1. Facteurs environnementaux .....	43
2.5.2. Facteurs génétiques .....	45
2.5.3. Impact de la perméabilité intestinale sur le développement des MICIs.....	48
2.5.4. Facteurs Microbiologiques .....	49

2.5.4.1.	Le microbiote intestinal.....	49
2.5.4.2.	Microbiote et MICIs.....	53
2.5.4.3.	Rôle des polymorphismes génétiques associés aux MICIs sur la composition du microbiote.....	55
Chapitre 3 : Le rôle de l'autophagie dans les MICIs .....		56
3.1.	Le processus d'autophagie .....	56
3.2.	Polymorphismes génétiques liés à l'autophagie.....	61
3.3.	Perturbations des fonctions liées à l'autophagie.....	62
3.3.1.	Impact direct de la xénophagie dans les MICIs .....	62
3.3.2.	Fonctions des cellules de Paneth .....	64
3.3.3.	Fonction de la barrière intestinale .....	65
3.3.4.	Fonction des cellules caliciformes.....	65
3.3.5.	Fonction de présentation antigénique.....	66
3.3.6.	Régulation de l'inflammasome.....	67
3.3.7.	Impact sur le stress du reticulum endoplasmique (RE).....	69
Chapitre 4 : Les probiotiques et leur impact dans les MICIs.....		71
4.1.	Historique et définition .....	71
4.2.	Sources des probiotiques .....	72
4.3.	Caractéristiques des probiotiques.....	73
4.3.1.	Caractères généraux des souches probiotiques.....	74
4.3.2.	Caractères spécifiques des souches probiotiques.....	76
4.4.	Mode d'action des probiotiques .....	83
4.4.1.	Modulation du microbiote intestinal .....	83
4.4.2.	Immunomodulation (stimulation de l'immunité ou activité anti-inflammatoire) .....	83
4.4.3.	Renforcement de la barrière intestinale .....	85
4.5.	Les probiotiques dans le contexte des MICIs.....	88
4.5.1.	Etudes <i>in vitro</i> .....	89
4.5.2.	Modèles expérimentaux.....	91
4.5.3.	Étude clinique chez l'homme .....	96
<b>OBJECTIFS</b> .....		99
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....		101
	Souches bactériennes et conditions de culture .....	102

Stimulation de cellules mononuclées (CMN) de sang humain.....	103
Stimulation de la lignée de cellules épithéliales humaines HT-29 .....	103
Stimulation de la lignée de cellules monocytaires humaines THP-1.....	104
Modèle <i>in vitro</i> de barrière intestinale .....	104
Préparation de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris (BMDCs).....	106
Stimulation des BMDCs et suivi de l'activation autophagique.....	106
Blocage de l'autophagie et stimulation des BMDC <i>in vitro</i> .....	108
Modèle murins de colite induite par l'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) .....	109
Modèle murin de colite induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) .....	112
Extraction d'ARN et qRT-PCR.....	113
<b>RESULTATS</b> .....	114
<b>Article 1</b> .....	115
Sélection de souches anti-inflammatoires <i>in vitro</i> .....	115
Les souches potentiellement probiotiques ont limité la perturbation de la fonction barrière de la monocouche épithéliale sensibilisée par de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	117
L'administration orale des souches bactériennes atténue la colite aiguë induite par le TNBS chez la souris.....	118
L'administration orale des souches bactériennes a atténué une colite de bas grade induite par le DSS chez la souris et a amélioré l'intégrité de la barrière intestinale .....	124
Discussion .....	126
Conclusions.....	129
Résultats complémentaires à l'article 1 .....	131
<b>Article 2</b> .....	133
Les souches bactériennes activent l'autophagie dans des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris (BMDC) .....	134
L'inhibition de l'autophagie augmente la production d'IL-1 $\beta$ et diminue la sécrétion d'IL-10 dans les cellules immunitaires humaines et les BMDC murines stimulées par des bactéries <i>in vitro</i> . .....	136
L'inhibition de l'autophagie <i>in vivo</i> limite les effets protecteurs de certaines souches dans un modèle murin de colite aiguë induit par le TNBS.....	137
Le rôle protecteur des BMDCs traitées par les souches bactériennes est aboli après inhibition pharmacologique de l'autophagie.....	140
Discussion .....	142



Conclusion .....	147
Résultats complémentaires à l'article 2 .....	148
Résultats préliminaires obtenus au Liban .....	150
<i>DISCUSSION GENERALE</i> .....	153
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> .....	162
<i>ANNEXES</i> .....	223

## **RESUME**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), qui comprennent les deux principales formes, la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), sont caractérisées par une inflammation chronique et récurrente de la muqueuse intestinale, ayant un impact considérable sur la qualité de vie. À l'heure actuelle, la prise en charge thérapeutique de la MC n'est pas curative et un tiers des patients ne réagissent pas aux traitements biologiques et aux immunosuppresseurs. Par conséquent, de nouvelles stratégies pour traiter cette maladie sont fortement attendues. La dérégulation de l'interaction entre d'une part les facteurs génétiques et le système immunitaire de l'hôte, et d'autre part le microbiote intestinal et les facteurs environnementaux, est impliquée dans le développement des MICI. Cette perturbation entraîne effectivement une augmentation de la perméabilité intestinale et une inflammation persistante. Restaurer le microbiote «dysbiotique» et les fonctions intestinales altérées représentent donc une thérapeutique alternative intéressante. De ce fait, les probiotiques sont une option intéressante et ont été utilisés avec succès chez des patients souffrant de pouchite et de RCH. Cependant, leur effet protecteur est clairement souche-dépendant et plusieurs souches probiotiques bien connues n'ont pu conduire à un résultat clinique probant, en particulier chez les patients souffrant de MC. Le décryptage des mécanismes moléculaires sera donc la clé pour permettre une recommandation efficace des probiotiques dans le traitement ou la prévention des MICI. La sélection de souches basée sur des critères de sélection bien définis et en utilisant des modèles bien maîtrisés est indispensable à ce processus. L'objectif principal de cette thèse était de sélectionner des lactobacilles et des bifidobactéries parmi une collection de souches françaises et libanaises, capables de présenter des propriétés protectrices contre les MICI, en se concentrant sur leurs capacités immuno-régulatrices et leurs capacités à renforcer la barrière épithéliale. Des approches *in vitro* ont été utilisées pour sélectionner des souches ayant une activité anti-inflammatoire et également capables d'améliorer la fonction de la barrière intestinale. Cinq souches ont été identifiées présentant des caractéristiques différentes, mais avec un potentiel thérapeutique élevé. Deux souches se sont révélées hautement protectrices dans deux modèles différents de colite aiguë et de colite de bas grade. Nos résultats ont confirmé en outre l'hypothèse selon laquelle la capacité des souches à atténuer l'inflammation est en partie due à l'amélioration de la barrière intestinale et à la restauration des protéines de jonction serrés.

Un nombre croissant d'études génétiques ont prouvé que l'autophagie peut affecter plusieurs aspects de la réponse immunitaire des muqueuses, notamment via l'élimination de bactéries intracellulaires, la sécrétion de peptides antimicrobiens, la production de cytokines pro-inflammatoires et la présentation des antigènes. Par conséquent, l'autophagie peut être considérée comme un mécanisme de régulation clé impliqué dans la

physiopathologie de la MC. Nous avons donc évalué la capacité des souches à activer cette voie et montré que les souches sélectionnées étaient en effet capables d'induire une activation de l'autophagie dans des cellules dendritiques murines. Nous avons démontré *in vitro* que le blocage de l'autophagie pouvait diminuer la capacité des souches à induire la sécrétion d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire et, inversement, à exacerber la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , cytokine pro-inflammatoire. Nous avons pu confirmer, à l'aide d'un modèle murin de colite, que la capacité protectrice d'une souche impliquait la machinerie autophagique, et nous avons pu mettre en évidence le rôle des cellules dendritiques dans ce processus. Nous proposons donc que l'autophagie est un nouveau mécanisme par lequel les probiotiques peuvent exercer leurs capacités immuno-régulatrices.

Mots clés : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, Probiotiques, Autophagie, Barrière épithéliale.

## **ABSTRACT**

Inflammatory bowel disease (IBD), including the two main types, Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is characterized by chronic, relapsing inflammation of the gut mucosa with considerable impact on the quality of life. At present, the therapeutic management of CD is not curative and one third of patients fails to respond to current biologicals and immunosuppressive drugs. Therefore new strategies for treating this disease are imperative.

The deregulation of the normal interplay between the genetics and immune system of the host on the one hand, and the gut microbiota and environmental factors on the other hand, is known to be associated with the development of IBD, as this disturbance is leading to increased intestinal permeability and persistent inflammation. Restoring the "dysbiotic" microbiota and the impaired intestinal functions represent an attractive therapeutic alternative. Probiotics represent therefore an interesting option and have been used quite successfully in patients suffering from pouchitis and UC. However, their protective effect is clearly strain-dependent and several well-known probiotic strains failed to fulfill the expected clinical outcome, especially when applied in CD. Deciphering the molecular mechanisms will be the key to the recommendation of probiotics for the treatment or prevention of IBD. Selecting strains on well-defined selection criteria and using well-studied models is indispensable to this process.

The main objective of this thesis was first to select lactobacilli and bifidobacteria from a collection of French and Lebanese strains that exhibited protective properties against IBD, focusing on their immunoregulatory capacities and their capacities to strengthen the epithelial barrier.

*In vitro* approaches were used to select strains with anti-inflammatory activity and also able to enhance intestinal barrier function. Five strains were identified with different characteristics, but entailing a high potential for the management of IBD. Two strains, e.g. were found to be highly protective in two different models of acute and low grade colitis. Our results furthermore support the hypothesis that the capacity of the strains to alleviate inflammation is in part mediated by the improvement of the intestinal barrier and the restoration of tight junction proteins.

A growing number of genetic studies provided strong evidence that autophagy machinery can affect several aspects of the mucosal immune response, including intracellular bacterial killing, antimicrobial peptide secretion, pro-inflammatory cytokine production and antigen presentation. Therefore, autophagy can be considered as a key regulator mechanism most likely involved in the physio-pathogenesis of CD.

We therefore evaluated the capacity of the strains to activate this pathway and showed that the selected strains were indeed able to induce autophagy activation in dendritic cells. We demonstrated *in vitro* that blocking the autophagy machinery can abolish the capacity to induce the secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 after immune cell stimulation, while exacerbating the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ . We could confirm, using a murine model of colitis, that the protective capacity of the selected strains indeed involves autophagy mechanisms, and we could highlight the role of dendritic cells in this process. We therefore propose here that autophagy is a novel mechanism through which probiotics can exhibit their immunoregulatory capacities.

Key-words: Inflammatory bowel disease, Probiotics, Autophagy, Epithelial barrier

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1: Structure du système digestif chez l'homme .....	19
Figure 2: Anatomie de l'intestin .....	20
Figure 3: Les différentes types de cellules présentes au niveau de l'épithélium intestinal ...	21
Figure 4: Interaction entre cellules épithéliales par les desmosomes, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes .....	23
Figure 5: Représentation schématique du système lymphoïde associé à l'intestin .....	26
Figure 6: Les voies de signalisation et les adaptateurs utilisés par les TLRs .....	30
Figure 7: Les cellules du système immunitaire inné et adaptatif .....	32
Figure 8: Polarisation des lymphocytes T naïfs après interaction avec les cellules dendritiques.....	34
Figure 9: Déséquilibre de la production des cytokines anti-inflammatoires et pro-inflammatoires chez les patients atteints de MICI .....	52
Figure 10: Les différentes phases de l'autophagie .....	58
Figure 11: les protéines clés impliquées dans la voie de l'autophagie.....	60
Figure 12: Les différentes étapes de la xénophagie .....	63
Figure 13: Voies d'activation de l'inflammasome et interregulation avec le processus d'autophagie et impact sur l'induction de cytokines pro-inflammatoires.....	69
Figure 14: Rôle de l'autophagie dans le contrôle de l'immunité et de l'homéostasie intestinale et conséquences de sa dérégulation au cours des MICI .....	70
Figure 15: Schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans les capacités bénéfiques des probiotiques dans le contexte des MICIs.....	161

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

AGCC: Acide Gras à Chaîne Courte

AIEC: Escherichia coli adhérents-invasifs

AMPK: AMP-kinase

APCs: Cellules présentatrices d'antigènes

ARN: Acide RiboNucléique

ARNm: ARN messenger

ATG: Autophagy related genes

ATG16L1: Autophagy 16 Like 1

CARD: Caspase-activation and recruitment domain

CCL20: Chemokine (C-C motif) Ligand 20

CFU: colony forming unit

CLR: Lectines de type C

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CRP: C-reactive protein

DAMP: damage-associated molecular patterns

DC: cellules dendritiques

DSS: Dextran Sulfate Sodium

EFSA: Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

EGF: Epidermal growth Factor

FAE: Follicle Associated Epithelium

FAO: Food and Agricultural Organization

Flt3-L: Fms-like tyrosine 3-ligand

G6P: Glucose 6 Phosphate

GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue

GATA3: GATA binding protein-3

GLP-1: Glucagon Like Peptide 1

GLP-2: Glucagon Like Peptide 2

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

GRAS: Generally Recognized as Safe

HDL: High Density Lipoprotein

HOPS: homotypic fusion and protein sorting

IBS: Syndrome du côlon irritable

IEL: Lymphocytes Intra-Epithéliaux

IFN: interféron

Ig: immunoglobulines

IL-: Interleukine

ILCs: Cellules Lymphoïdes Innées

ILF: Follicules Lymphoïdes Isolés

IRF: Interferon regulatory factor

IRGM: Immunity related GTPase M

I $\kappa$ B $\alpha$ : Inhibitor of NF- $\kappa$ B $\alpha$

JAM: Junctional Adhesion Molecule

LAB: bactéries lactiques

LDL: Low Density Lipoprotein

LPS: Lipopolysaccharide

LRR: Leucine-rich repeat

LTA: Acide Lipoteichoïques

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MALT: Mucosa-Associated Lymphoid Tissues

MAMP: microbial associated molecular patterns

MC: Maladie de Crohn

MDP: muramyl dipeptide

MICI: Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin



MIP-3 $\alpha$ : Macrophage Inflammatory Protein-3 $\alpha$

MLN: ganglions lymphatiques mésentériques

MUC2: Mucine de type 2

MUC3: Mucine de type 3

MyD88: Myeloid differentiation

NKT: Natural Killer T

NLR: Nucleotide oligomerization domain like receptor

NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

QPS: Qualified Presumption of Safety

PAM: Peptides Anti-Microbiens

PAMP: pathogen associated molecular patterns

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS: Phosphate Buffered Saline

PE: phosphatidylethanolamine

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase de type 3

PP: Plaques de Peyer

PRR: pattern recognition receptors

RCH: Rectocolite Hémorragique

RE: reticulum endoplasmique

RLR: Retinoic acid inducible gene 1 like receptor

ROR: Retinoic acid -related Orphan Receptor

SNARE: Soluble NSF attachment protein receptor

SCFA: Short Chain Fatty Acid

TCR: Récepteur à l'antigène

TEER: Résistance Electrique Trans- Epithéliale

TIR: Toll/IL-1R interaction domain

TLR: Toll like receptor

TNBS: 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid

TNFSF15: TNF Superfamily Member 15

UPR unfolded protein response

VDR: vitamin D receptor

ZO: Zonula Occludens

***INTRODUCTION***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

# Chapitre 1 : Le système immunitaire du tube digestif

## 1.1. Structure du tube digestif

Le tractus digestif ou tractus gastro-intestinal est composé de plusieurs organes : l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin ou colon. Il joue un rôle majeur dans la digestion des aliments et l'absorption de l'eau, des nutriments et des électrolytes. Avec une surface comprise entre 200 et 300 m<sup>2</sup> chez l'homme, la muqueuse intestinale représente la principale surface d'échange entre le milieu extérieur et le corps humain. Concernant l'intestin, il se divise en deux parties : l'intestin grêle et le colon qui se situent dans la partie inférieure du tractus digestif et assure, en plus de sa fonction d'absorption, une fonction de barrière (Figure 1).

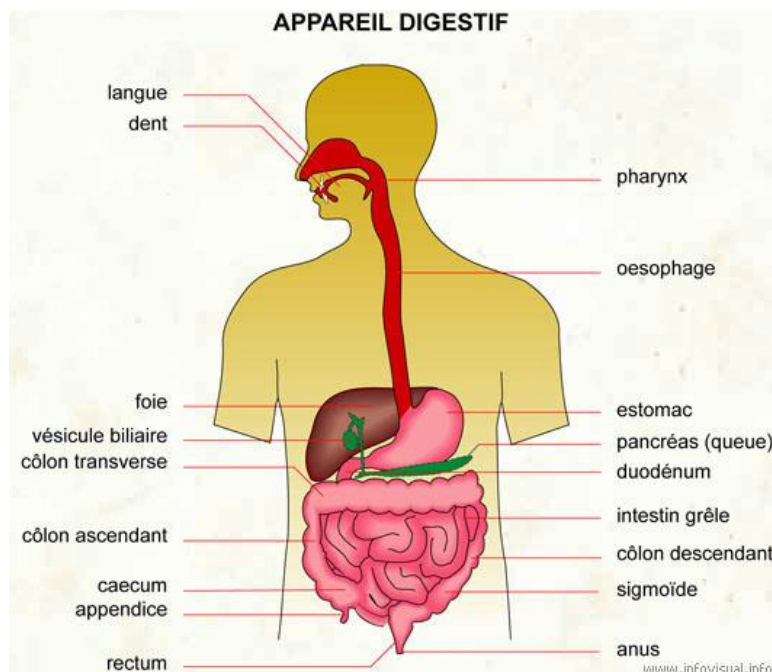
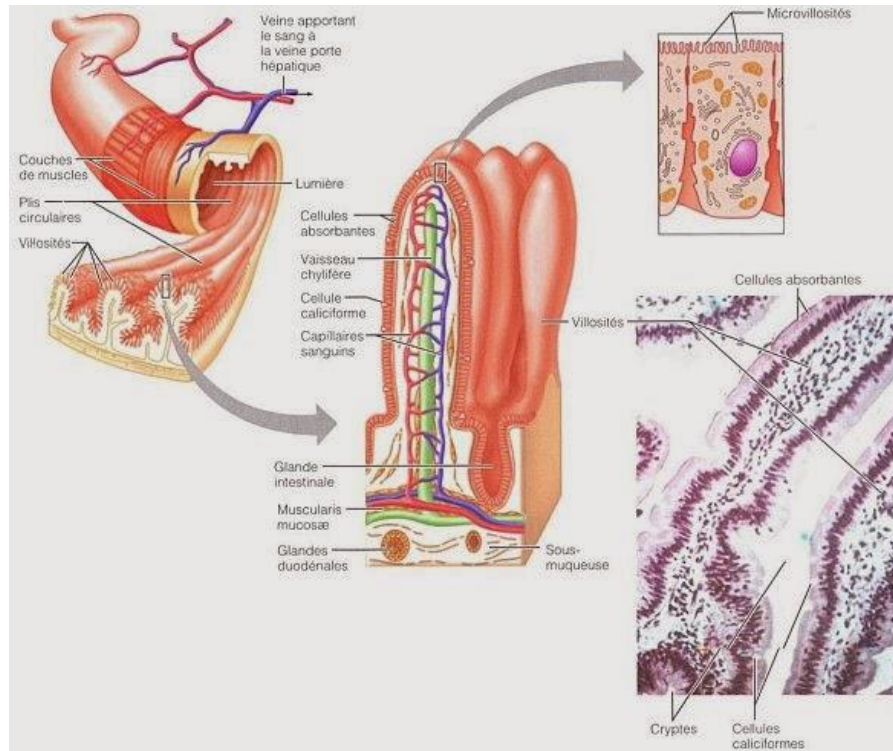


Figure 1: Structure du système digestif chez l'homme

## 1.2. Anatomie et fonction de l'intestin

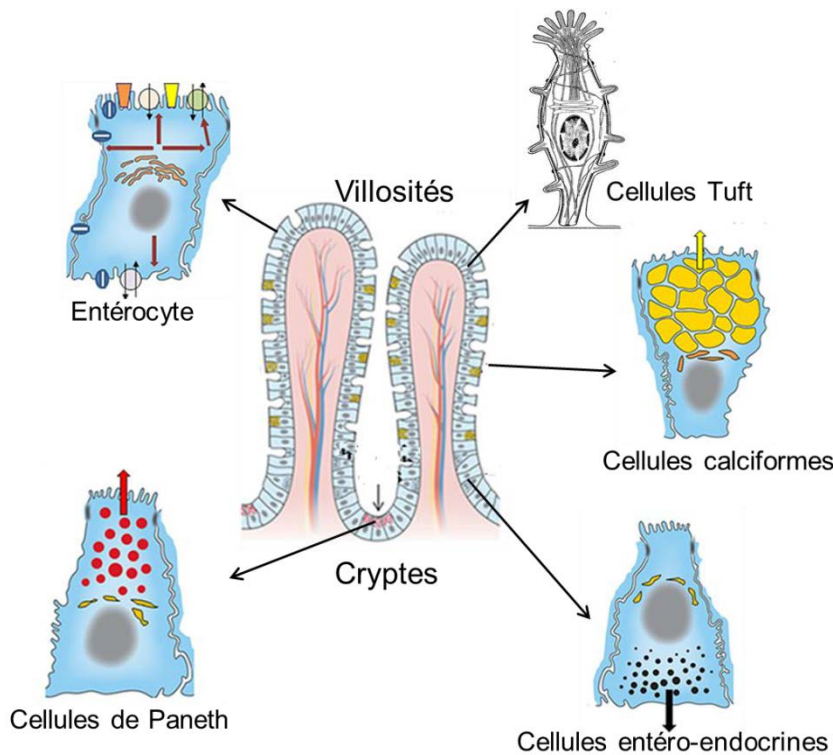
L'intestin grêle est un cylindre musculaire creux qui mesure de 4 à 7 mètres de long et son diamètre est d'environ 5 cm. Il est composé de trois segments : l'iléon, le jéjunum et le duodénum. La paroi intestinale est constituée de quatre couches : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse allant respectivement de l'extérieur de la paroi vers l'intérieur. La muqueuse intestinale présente des villosités et des cryptes augmentant la surface de contact et améliorant ainsi l'absorption des nutriments au niveau de l'intestin grêle (Figure 2) (Elgazzar, 2015).



**Figure 2: Anatomie de l'intestin (d'après Marieb *et al.*, 1999)**

Les villosités intestinales sont principalement constituées de cellules épithéliales polarisées ou entérocytes constituant jusqu'à 80% des cellules. Les entérocytes assurent, la fonction d'absorption des nutriments grâce à la présence, à leur pôle apical, de microvillosités riches en enzymes de digestion telles que des hydrolases (van der Flier and Clevers, 2009). Elles sont reliées entre elles par des jonctions serrées créant ainsi une barrière étanche. Les villosités intestinales présentent également des cellules caliciformes ou cellules de Goblet sécrétant par exocytose le mucus dans la lumière intestinale. Celui-ci est constitué d'une matrice de glycolipides et de glycoprotéines. Des cellules entéro-endocrines présentes en plus faible quantité au niveau de l'intestin grêle jouent également un rôle fondamental dans la motilité gastro-intestinale et le contrôle de la prise alimentaire par la production d'hormones telles que la sérotonine, la cholécystokinine, la sécrétine, la substance P, la gastrine, la motiline, le glucagon et ses dérivés (GLP-1 et GLP-2) et la somatostatine (Höcker and Wiedenmann, 1998). On trouve également en faible nombre des cellules Tuft dont le rôle n'est pas encore très bien connu, mais qui semble jouer un rôle critique dans la régulation des réponses immunitaires intestinale, notamment en produisant certaines molécules nommées alarmines, telle que l'interleukine 25, connue comme essentielles pour éliciter la réponse immune de type 2 impliquées dans la défense anti-parasitaire (Gerbe *et al.*, 2016). Au fond des cryptes se trouvent les cellules de Paneth qui sont notamment

capables de sécréter des peptides anti-microbiens. Les cellules de Paneth, qui sont de forme pyramidale, ne migrent pas de la crypte vers les villosités mais restent au fond des cryptes de l'intestin grêle. Par la production de peptides antimicrobiens tels que les  $\alpha$ - et  $\beta$ -défensines, le lysozyme, la lectine RegIII $\gamma$  et la phospholipase A2, les cellules de Paneth jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie intestinale et de la régulation du système immunitaire inné (Brandl et al., 2007; Salzman et al., 2007). Au niveau des cryptes, les cellules les plus communes sont les cellules de crypte indifférenciées, qui sécrètent du chlorure et de l'eau dans la lumière intestinale. La crypte contient également des cellules souches multipotentes qui ont un rôle principale dans le renouvellement des cellules (entérocytes, cellules calciformes et entéro-endocrines) par un mécanisme de différenciation et de migration vers la villosité (Sancho et al., 2003; van der Flier and Clevers, 2009) (Figure 3).



**Figure 3: Les différents types de cellules présentes au niveau de l'épithélium intestinal (d'après Liévin-Le Moal and Servin, 2013)**

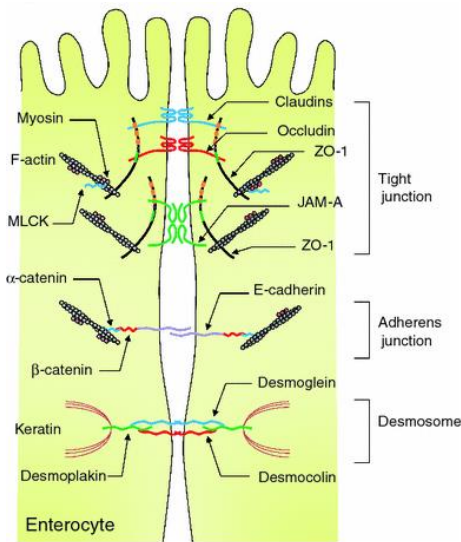
Le côlon, appelé aussi gros intestin, est une structure tubulaire qui s'étend de la valvule iléo-colique jusqu'à l'anus. Sa longueur est d'environ 1,5 mètre et se compose du caecum, le côlon lui-même et le rectum. Comme l'intestin grêle, la paroi du colon est constituée d'une muqueuse, d'une sous-muqueuse, d'une musculuse et d'une séreuse. Cependant, la

muqueuse du côlon ne présente pas de villosités. La fonction primaire du côlon est d'absorber l'eau et les électrolytes de son contenu et d'éliminer les matières fécales (Elgazzar, 2015).

### **1.3. Perméabilité de l'épithélium intestinal**

L'absorption des nutriments issus de l'alimentation est la première fonction de l'intestin. La muqueuse intestinale constituant une porte d'entrée pour les micro-organismes potentiellement pathogènes, il est important qu'elle dispose d'un mécanisme permettant le passage des molécules d'intérêt tout en limitant celui des microorganismes pathogènes et autres molécules toxiques. L'interaction entre les cellules épithéliales de l'intestin est importante pour maintenir l'intégrité de la barrière intestinale. Cette intégrité est assurée par les desmosomes, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes. Les jonctions serrées sont principalement responsables du contrôle de la perméabilité paracellulaire entre les cellules épithéliales et permettent le passage des molécules en fonction de la taille des pores, tandis que les desmosomes et les jonctions d'adhésion sont nécessaires pour la communication et la liaison entre les cellules (Figure 4) (Suzuki, 2013).

Les jonctions serrées constituent de multiples complexes protéiques situés aux extrémités apicales des membranes latérales des cellules épithéliales intestinales principalement au niveau des villosités. Le passage paracellulaire de l'eau et des ions est régulé par les jonctions serrées. Elles sont également connues comme barrière pour maintenir la polarité cellulaire en bloquant la diffusion des lipides et des protéines entre les domaines apical et basolatéral de la membrane plasmique (Farhadi et al., 2003; Turner, 2009). Quatre groupes de protéines transmembranaires, l'occludine (Furuse et al., 1993), les claudines (Furuse et al., 1998), la JAM (Junctional Adhesion Molecule) (Martín-Padura et al., 1998) et la tricelluline (Ikenouchi et al., 2005) ont été identifiés. Les domaines intracellulaires de ces protéines transmembranaires interagissent avec des protéines d'échafaudage cytosoliques, telles que les protéines ZO (zonula occludens). L'interaction de cytosquelette d'actine avec les jonctions serrées est nécessaire pour maintenir leur fonction ainsi que leur structure. De plus, l'interaction du complexe de jonctions serrées avec le cycle actomyosine permet la régulation cytosquelettique de l'intégrité de la barrière (Figure 4).



**Figure 4: Interaction entre cellules épithéliales par les desmosomes, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes (d'après Suzuki, 2013)**

### 1.3.1. L'occludine

L'occludine est une protéine transmembranaire avec quatre régions liées à une boucle intracellulaire et deux boucles extracellulaires. Une barrière entre les cellules est formée grâce à l'interaction entre les boucles extracellulaires de l'occludine et les cellules adjacentes. Le poids moléculaire est de 65 kDa (Furuse et al., 1993). Du côté cytoplasmique, l'occludine possède une courte extrémité N-terminal et C-terminal plus long qui interagit avec les protéines intracellulaires des jonctions serrées telles que les protéines ZO, essentielles pour lier l'occludine au cytosquelette d'actine (Suzuki, 2013). L'occludine joue un rôle essentiel dans le contrôle de la perméabilité et la structure des jonctions serrées dans l'épithélium intestinal. L'importance de l'occludine dans le maintien et la formation des jonctions serrées a été étudiée *in vivo* à l'aide de modèles de souris déficientes pour l'occludine et dans des modèles *in vitro* (cellules Caco-2). La déficience en occludine induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire des macromolécules, indiquant que l'occludine est importante pour leur flux paracellulaire (Al-Sadi et al., 2011; Saitou et al., 2000; Schulzke et al., 2005). Une déficience en occludine n'affecte pas la résistance dans des modèles de culture de cellules épithéliales intestinales (Al-Sadi et al., 2011) ni la perméabilité au mannitol chez la souris (Saitou et al., 2000; Schulzke et al., 2005), cependant les souris déficientes présentent une inflammation chronique au niveau de l'épithélium gastrique (Saitou et al., 2000) et une diminution de la sécrétion d'acides gastriques (Schulzke et al., 2005). De plus, la diminution de l'expression de l'occludine affecte l'expression d'une autre protéine des jonctions serrées, la claudine-2. L'occludine joue donc un rôle important dans l'intégrité intestinale et est nécessaire pour la maintenance et l'assemblage des jonctions serrées (Al-Sadi et al., 2011).



### **1.3.2. Les claudines**

Les claudines, qui composent une famille de 24 membres chez l'Homme (Lal-Nag and Morin, 2009) sont considérées comme l'épine dorsale et le composant clé des jonctions serrées, rendant ces protéines très importantes pour l'intégrité intestinale. Leurs poids moléculaires varient de 20 à 27 kDa (Suzuki, 2013). Les claudines possèdent une boucle intracellulaire et deux boucles extracellulaires avec une extrémité intracellulaire N-terminal courte et une extrémité C-terminal longue qui interagit avec les protéines intracellulaires des jonctions serrées telles que les protéines ZO (Groschwitz and Hogan, 2009; Van Itallie and Anderson, 2006). A travers les boucles extracellulaires, les claudines des cellules adjacentes interagissent entre elles ou avec d'autres protéines, formant une barrière ou des pores pour le passage des molécules sélectives dans les voies paracellulaires (Groschwitz and Hogan, 2009). Les claudines peuvent être subdivisées en deux groupes: les claudines 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11 et 14 formant une barrière et les claudines 2, 7, 12 et 15 formant des pores (Suzuki, 2013). Le niveau d'expression des claudines varie au long du tube digestif (John et al., 2011; Suzuki, 2013). Les claudines formant des barrières, telles que les claudines-1, 3, 4, 5 et 8 sont plus fortement exprimées dans le duodénum et le côlon, tandis que dans l'iléon et le jéjunum, ce sont les claudines qui forme des pores, telles que claudines-2, 7 et 12 qui sont les plus exprimées puisque les nutriments sont principalement absorbés dans l'intestin grêle, tandis que l'absorption est faible dans le côlon. Des études récentes utilisant des souris déficientes pour les claudines ont montré que les claudines jouent un rôle important dans le maintien de la barrière physique. De plus, Les claudines jouent un rôle essentiel dans la sélection du passage des ions au travers des jonctions serrées (Groschwitz and Hogan, 2009; John et al., 2011).

### **1.3.3. Les protéines ZO (zonula occludens)**

Les protéines de la famille ZO (ZO-1, 2 et 3) sont des protéines d'échafaudage multi-domaines qui interagissent directement avec les protéines des jonctions serrées transmembranaires telles que les claudines et l'occludine (Cording et al., 2013; Raleigh et al., 2010). Les protéines de la famille ZO interagissent également avec le cytosquelette d'actine et une variété d'éléments régulateurs de l'actine (Fanning et al., 2002; Fanning and Anderson, 2009; Lee, 2015). Parmi les protéines ZO, la fonction et la propriété de ZO-1 ont été bien étudiées. Par conséquent, il a été suggéré que les protéines ZO peuvent médier l'assemblage des protéines des jonctions serrées au niveau du contact cellule-cellule. Elles jouent aussi un rôle essentiel dans la régulation de la structure des jonctions serrées (Lee, 2015). Les cellules déficientes en ZO-1 sont encore capables de former des structures normales de jonctions serrées et ne présentent pas de perméabilité accrue, cependant, un

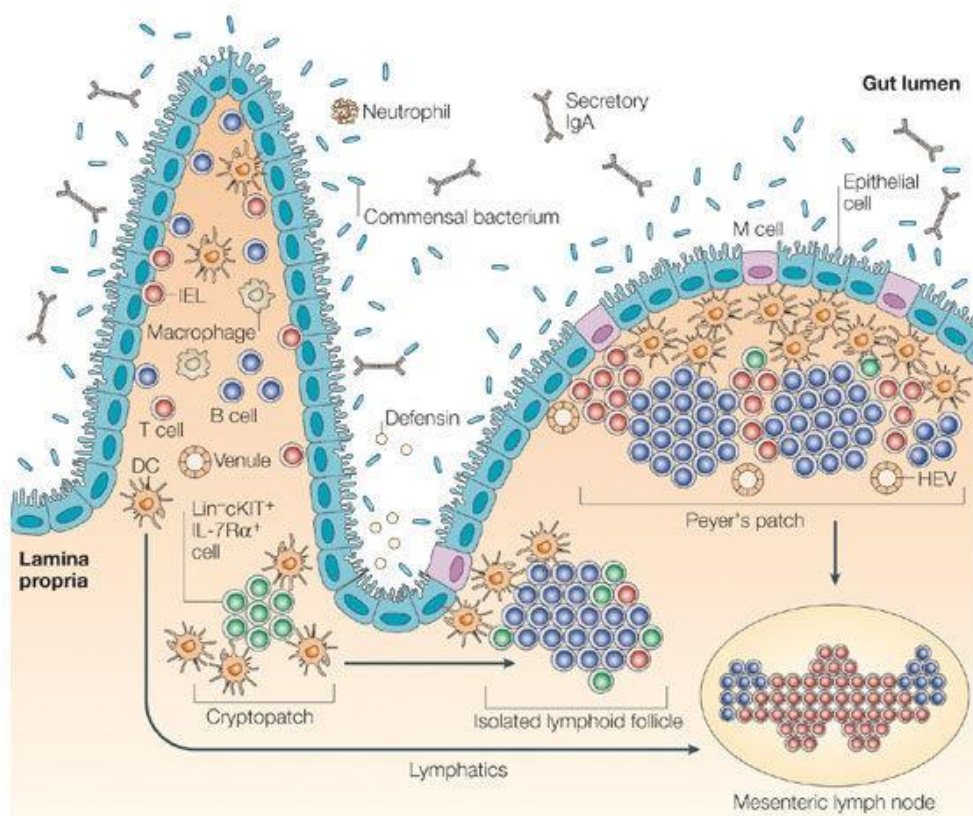
retard évident dans l'assemblage d'autres protéines des jonctions serrées incluant l'occludine et les claudines est observé, indiquant que les protéines ZO ont un rôle essentiel dans la contrôle de l'assemblage des jonctions serrées (Umeda et al., 2004).

#### **1.4. Le système lymphoïde associé à l'intestin**

La *lamina propria* et la muqueuse intestinale représentent le plus grand organe lymphoïde chez l'homme: le système lymphoïde associé à l'intestin (GALT, Gut-Associated Lymphoid Tissue). Ce dernier constitue la partie la plus complexe et la plus importante du système immunitaire humain. Il est divisé en deux sites: les sites effecteurs et les sites inducteurs de la réponse immunitaire. Il regroupe les lymphocytes intra-épithéliaux de la *lamina propria* (sites effecteurs) et les ganglions mésentériques (MLN), les cryptopatches, les follicules lymphoïdes isolés (ILF) et les plaques de Peyer (PP) (sites inducteurs) (Brandtzaeg and Johansen, 2005; Chandran et al., 2003; Geddes et al., 2011).

Les PP sont retrouvées dans l'intestin grêle au niveau de la sous-muqueuse. Elles sont constituées d'au minimum cinq follicules lymphoïdes. Ces structures ressemblent à des ganglions lymphatiques. Elles comprennent un centre germinatif, composé de lymphocytes B immatures qui vont se différencier principalement en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines A (IgA). Ces lymphocytes sont entourés par des zones inter-folliculaires comprenant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ainsi qu'une variété de cellules présentatrices d'antigène tels que les macrophages et les cellules dendritiques (DCs). Le côté luminal des PP est surmonté par des follicules (FAE, Follicle-Associated Epithelium) composées de cellules cylindriques épithéliales. La principale caractéristique des FAE est la présence de cellules M qui sont dérivées de cryptes adjacentes et possèdent des microfolds spécialisés (Ohno, 2016). Chez l'homme, Les cellules M ne possèdent pas de microvillosités, mais des microfibrilles sur la membrane au niveau du côté apical. Ces cellules sont principalement placées au niveau du dôme des PP dans l'intestin grêle et font partie du GALT. Les cellules M peuvent être également retrouvées dans le côlon (Miller et al., 2007). Les cellules M ne semblent pas capables de reconnaître les antigènes car ils n'expriment pas, ou peu, de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) (Neutra et al., 1996). Leur rôle principal est de transporter les micro-organismes et les antigènes intestinaux de la lumière intestinale vers les cellules immunitaires tel que les DC, qui sont des cellules présentatrices d'antigène qui vont ensuite permettre l'activation de cellules immunitaires telles que les cellules B (Miller et al., 2007; Neutra et al., 2001). Les cellules M, ainsi que les DC intraépithéliaux, sont importants pour la communication entre l'environnement luminal et le système immunitaire (Figure 5) (Neutra et al., 2001).

Les MNL sont constitués d'une couche extérieure comprenant des cellules B disposées en follicules lymphoïdes (cortex) et d'une zone peuplée principalement de cellules T et de DC (para-cortex). Les vaisseaux lymphatiques afférents apportent les antigènes intestinaux de la *lamina propria* et de l'épithélium vers les ganglions mésentériques qui sont captés par les DCs qui vont les présenter aux lymphocytes T effecteurs pour induire leur différenciation. Les MLN jouent également un rôle important dans la régulation des réponses humorales puisque l'ablation de ces organes lymphoïdes augmente la réponse IgA vis-à-vis d'antigènes (Figure 5) (Hahn et al., 2010).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 5: Représentation schématique du système lymphoïde associé à l'intestin (d'après Eberl, 2005)**

## 1.5. Le système immunitaire intestinal

L'immunité est un système complexe permettant une protection contre les micro-organismes pathogènes et les éléments exogènes. Ce système immunitaire se divise en

immunité innée et adaptative. Le système immunitaire associé à l'intestin est l'objet d'une régulation complexe et possède une double fonction : (i) la défense anti-infectieuse qui permet de limiter la prolifération des pathogènes et (ii) la tolérance vis-à-vis des antigènes luminaux alimentaires et bactériens. En conditions physiologiques, l'interaction étroite entre le contenu luminal et les cellules de l'immunité conduit à une réponse tolérante favorisant la production d'IgA et la différenciation en lymphocytes T régulateurs (Treg), capables de différencier des microorganismes pathogènes parmi les antigènes alimentaires et ceux des bactéries commensales, conduisant à un équilibre immunitaire appelé homéostasie intestinale.

### **1.5.1. Immunité innée**

Le système immunitaire inné est un système de défense intrinsèque notamment contre les micro-organismes et les allergènes présents dans un organisme. Il est non-spécifique, immédiat et représente la première ligne de défense contre les agents pathogènes et ne confère pas une immunité durable. Cependant, il est rapide et essentiel dans l'élimination de 99,9% des organismes pathogènes. Le système immunitaire inné est composé de barrières anatomiques, de récepteurs qui détectent les motifs structuraux conservés des microorganismes et de multiples types de cellules immunitaires tels que polynucléaires neutrophiles, macrophages, DCs, monocytes, cellules Natural Killer (NK) et les cellules lymphoïdes innées (ILCs) qui permettent une réponse inflammatoire rapide et efficace (Goldberg et al., 2015). Ces réponses immunitaires représentent non seulement la première ligne de défense contre l'infection, mais aussi par la production de cytokines et la présentation d'antigènes, elles aident à assurer la mise en place d'une protection immunitaire spécifique par l'induction et l'activation des lymphocytes T et de la réponse immunitaire adaptative (Geremia et al., 2014).

#### **1.5.1.1. Les barrières innées**

La couche de mucus est la première barrière de défense contre les antigènes issus des aliments, des microorganismes endogènes et iatrogènes (McGuckin et al., 2011). Le mucus est produit par des cellules caliciformes et est principalement composé de mucines. Il est constitué d'une couche interne et une couche externe. La couche interne est plus visqueuse et forme ainsi une zone de protection proche des cellules épithéliales, riche en peptides antimicrobiens dans laquelle la mobilité bactérienne est réduite, empêchant l'invasion par les pathogènes. La couche externe du mucus est peu visqueuse et contient des mucines et des peptides antimicrobiens. Cette couche est colonisée par des bactéries commensales qui rentrent en compétition nutritionnelle avec les bactéries pathogènes. De plus, les bactéries commensales vont occuper les niches et ainsi prévenir la colonisation par les bactéries

pathogènes (Johansson et al., 2008; Swidsinski et al., 2007). La couche de mucus aide aussi à prévenir les lésions physiques de l'épithélium et à préserver la distance entre les antigènes et les cellules épithéliales. Ce rôle a été démontré tout d'abord *in vivo* chez des souris déficientes pour le gène *muc-2*, responsable de la production de certaines mucines. Ces souris ont développé spontanément une colite (Van der Sluis et al., 2006a). La déficience en protéine MUC2 est également associée au cancer colorectal chez ces souris. Les autres acteurs de la barrière intestinale sont représentés par des actions mécaniques induites par les mouvements péristaltiques de l'intestin et du côlon, d'actions chimiques (pH acide, enzymes, peptides antimicrobiens...) ainsi que par des barrières physiologiques contre les agents pathogènes.

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont sécrétés par les cellules de Paneth et les cellules épithéliales pour assurer la défense de l'organisme vis-à-vis des pathogènes et contrôler la colonisation des bactéries commensales. Les PAMs intestinaux comprennent l'alpha- et la bêta-défensine, les cathélicidines, les lectines de type C et l'angiogénine (Klag et al., 2013). Les défensines sont des antibiotiques endogènes qui agissent contre les champignons, bactéries, virus et protozoaires et constituent la famille principale des peptides antimicrobiens la plus exprimée et abondante dans l'intestin (Zaslhoff, 2002). Ce sont de petites molécules chargées positivement, de poids moléculaires compris entre 2 et 6 kDa qui possèdent dans leurs structures un ou plusieurs ponts disulfure (Boman, 1995). Les défensines peuvent directement perturber la structure microbienne chargée négativement par liaison cationique et également protéger contre l'invasion microbienne (Chu et al., 2012). Les PAMs sont plus concentrés dans la couche muqueuse interne qui maintient ainsi sa stérilité, par rapport à la couche muqueuse externe qui contient les bactéries commensales.

#### **1.5.1.2. Les Récepteurs de l'immunité innée**

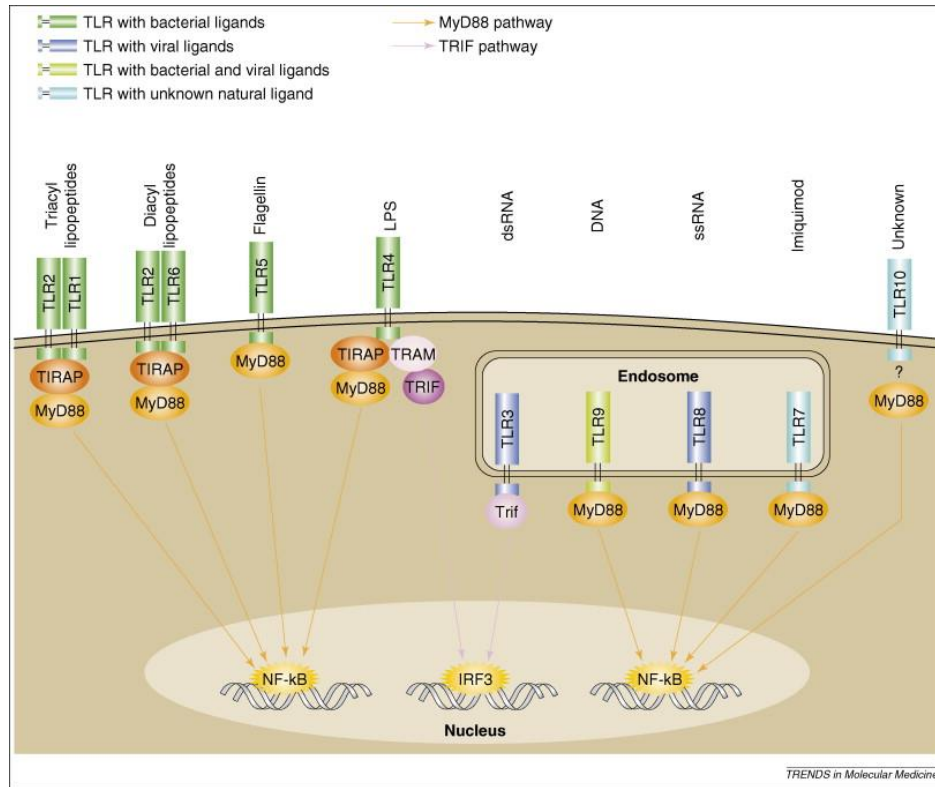
##### **Les « Pattern Recognition Receptors » (PRR)**

La reconnaissance des PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou MAMP (Microbe-Associated Molecular Patterns) qui sont des motifs moléculaires conservés associés aux agents pathogènes/microbiens par les récepteurs de reconnaissance des pathogènes PRR (Pathogen Recognition Receptors) induit l'initiation de la réponse immunitaire innée. Les PRRs sont aussi impliqués dans la reconnaissance des DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) qui sont des signaux de danger non-microbiens. Les PRR sont regroupés en plusieurs grandes familles : les TLR (Toll-Like Receptor), les NLR (Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD) -like receptors), les RLR (Retinoic acide-inducible gene-L-like Receptors) et les CLR (C-type Lectin Receptors). Ces PRRs peuvent être

exprimés par les macrophages, les cellules épithéliales intestinales, les DCs, les cellules lymphocytaires et les cellules stromales. L'activation des PRRs favorise notamment la maturation des cellules présentatrices d'antigènes et provoque une cascade de réactions conduisant à l'activation de voies de signalisation intervenant dans l'inflammation et la réponse anti-microbienne permettant ainsi de restaurer l'homéostasie intestinale. De plus, ils conduisent à l'activation de l'immunité adaptative.

### **Les TLR (Toll-Like Receptor)**

Les TLRs sont des glycoprotéines transmembranaires qui sont caractérisées par un domaine extracellulaire présentant un nombre variable de motifs répétés riches en leucine (Leucine-Rich Repeats « LRR ») et un domaine intracellulaire effecteur TIR (Toll/IL-1 Receptor) qui reconnaît les composants membranaires associées à des agents pathogènes extracellulaires (Geremia et al., 2014). La stimulation des TLRs par des antigènes ligands microbiens conduit à la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires, de peptides antimicrobiens et d'interférons (IFN) de type 1, ainsi que d'autres effecteurs permettant à l'hôte de lutter contre les pathogènes. Lorsque les TLRs sont activés, différentes molécules adaptatrices transmettent les signaux dont MyD88 (Myeloid Differentiation primary response 88) qui est l'adaptateur principal, cependant l'activation peut être MyD88 dépendante ou indépendante (Figure 6). Il s'en suit une activation d'autres molécules dont des kinases qui vont conduire à l'induction ou à la suppression de gènes qui orchestrent la réponse immunitaire. Les cellules présentatrices d'antigènes activées par les TLRs jouent un rôle essentiel dans l'activation du système immunitaire adaptatif et des lymphocytes T par une co-stimulation. Dix types de TLRs ont été trouvés chez l'homme. Parmi ceux-ci, les TLRs 2, 3, 4 et 5 ont un rôle important au niveau de l'intestin (Abreu et al., 2005; Szebeni et al., 2008; Testro and Visvanathan, 2009). Les TLRs 2, 4 et 5 sont présents au niveau de la membrane plasmique, tandis que TLR3 est intracellulaire. Le TLR2 détecte les composants de surface des bactéries à Gram positif, des mycobactéries et des champignons, tandis que le TLR4 reconnaît surtout les lipopolysaccharides (LPS) de la paroi des bactéries à Gram négatif, induisant ainsi l'expression de gènes inflammatoires par la voie NF- $\kappa$ B (Facteur Nucléaire kappa B) (Medzhitov, 2007) et la libération de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 et IL-8. Le TLR4 reconnaît également les ligands endogènes libérés pendant le stress cellulaire ou la nécrose (Testro and Visvanathan, 2009). Le TLR3 détecte les ARN viraux double brin, générés au cours de la réplication du virus et le TLR5, situé sur les surfaces basolatérales de l'épithélium intestinal, reconnaît la flagelline (Testro and Visvanathan, 2009). Il a été démontré que la signalisation TLR dans l'intestin intervient dans la prolifération des cellules épithéliales (Fukata et al., 2009, 2006), la production d'IgA (Shang et al., 2008), le maintien des jonctions serrées (Cario et al., 2004) et l'expression des peptides.



**Figure 6: Les voies de signalisation et les adaptateurs utilisés par les TLRs (d'après Liu et al., 2007)**

### Les NLRs (NOD-like receptors)

Les NLRs sont composés de récepteurs intracellulaires caractérisés par un domaine NOD et comprennent une séquence riche en leucine LRR responsable de la reconnaissance des ligands et des motifs microbiens (Zhong et al., 2013). Un domaine central NOD permet la liaison des nucléotides et l'auto-oligomérisation, et le domaine N-terminal, qui possède des domaines d'interaction protéine-protéine comme les domaines de recrutement des caspases (CARD), le domaine BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat) et le domaine pyrine (PYD), est impliqué dans l'initiation de la signalisation. Certains NLRs tels que NOD1, NOD2 et NLRC4 reconnaissent des motifs microbiens, d'autres tels que NLRP1 et NLRP3 détectent des signaux de danger.

### Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD)

Les récepteurs NOD1 et NOD2, après interaction avec la sérine thréonine kinase, peuvent activer les voies de signalisation NF-κB et MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Le récepteur NOD2 détecte le muramyl-dipeptide (MDP), motif conservé de la paroi (du peptidoglycane) des bactéries à Gram-positif et Gram-négatif. Le récepteur NOD1, reconnaît lui plus spécifiquement le γ-d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid, dipeptide issu de la dégradation du peptidoglycane des bactéries à Gram négatif. Après reconnaissance des

ligands, les protéines NOD vont s'activer, rompant leurs liaisons intra-protéiques en s'associant avec la kinase RIP2 par l'intermédiaire de leurs domaines CARD, ce qui conduit à l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et induit la production de cytokines inflammatoires (Girardin et al., 2003; Zhong et al., 2013). Les cellules de Paneth et les monocytes sont caractérisés par une forte expression de NOD2, impliqué dans la production des peptides anti-microbiens (Lala et al., 2003). En présence d'une mutation du gène NOD2, l'expression des défensines est ainsi diminuée (Wehkamp et al., 2005).

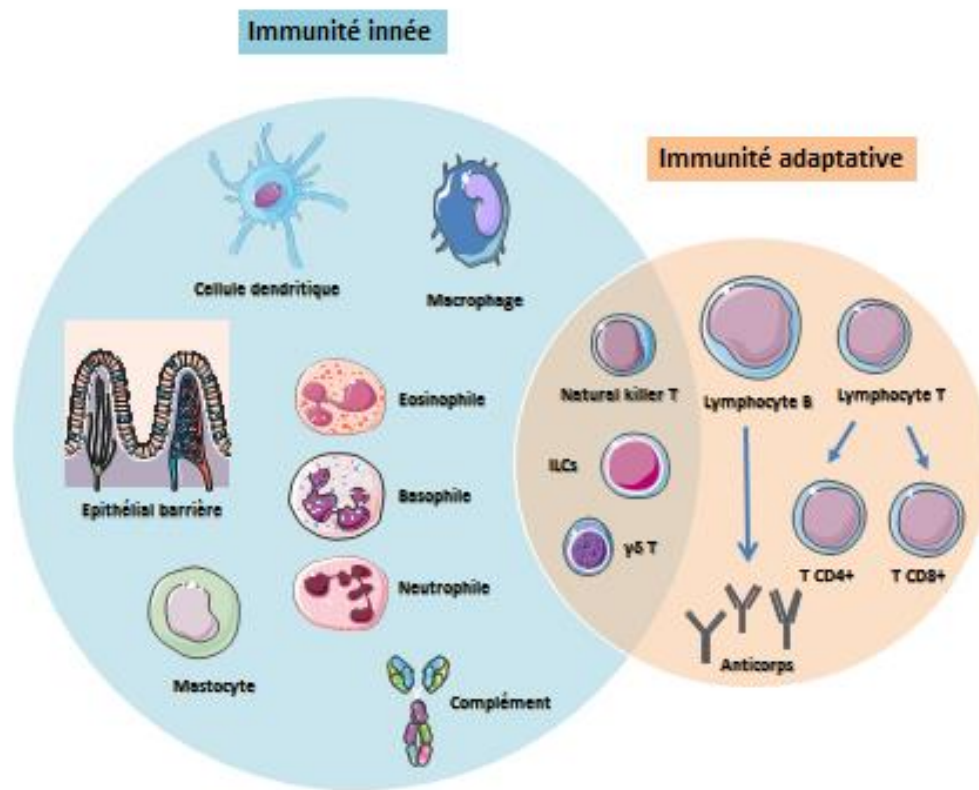
### **Inflammasomes**

Les inflammasomes sont des complexes multimoléculaires formés par certains membres de la famille des NLR, telles que NLRC4, NLRP1 et NLRP3. Ces structures sont assemblées en réponse à des stimuli endogènes et microbiens pour lutter contre les perturbations de l'homéostasie cellulaire. Lors d'un stimulus inflammatoire, telle que la reconnaissance de ligands bactériens par les TLRs ou NLRs, l'activation conduit à la synthèse de pro-IL-1 $\beta$  et de pro-IL-18 et le recrutement de la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis Associated Speck-like protein Containing a CARD) et de la pro-Caspase 1. Cette dernière se trouve alors clivée en caspase-1 active, capable de cliver les cytokines pour induire la maturation des deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 qui vont favoriser le recrutement de cellules phagocytaires, l'angiogenèse, la réparation épithéliale, et la régulation des cytokines et des chimiokines par d'autres cellules sur le site de la lésion (Franchi et al., 2012). Les inflammasomes jouent donc un rôle important pour contrôler les interactions hôte-microbiote (Levy et al., 2015) et des signaux cytokiniques. Ils sont également impliqués dans la mise en place d'une mort cellulaire spécifique, la pyroptose.

#### **1.5.1.3. Les cellules du système immunitaire inné**

Les cellules impliquées dans le système immunitaire inné sont les neutrophiles et autres granulocytes, les macrophages, les cellules NK, les cellules lymphoïdes innées et les mastocytes (Figure 7). Les macrophages et les cellules dendritiques font la liaison entre l'immunité innée et l'immunité adaptative en raison de leur double rôle dans la sécrétion des cytokines qui stimulent les cellules immunitaires innées et permettent le recrutement des monocytes, des neutrophiles, des macrophages et des cellules NK et NKT (Natural Killer T) mais ont surtout un rôle en tant que cellules présentatrices d'antigènes, capables ainsi de présenter des antigènes aux cellules T dans le contexte du CMH et d'induire leur polarisation.





**Figure 7: Les cellules du système immunitaire inné et adaptatif**

### **Les cellules lymphoïdes innées (ILCs)**

Les ILCs relient le système immunitaire inné et adaptatif et aident à maintenir l'intégrité de la barrière intestinale. Les ILCs s'accumulent dans les tissus des muqueuses et produisent des cytokines. Ces cellules ne possèdent pas de récepteurs spécifiques d'antigènes recombinants, ni de marqueurs phénotypiques classiques (Goldberg et al., 2015). Elles sont regroupées en fonction de l'expression de facteurs de transcription et de cytokines (Spits et al., 2013). Les ILCs du groupe 1 (cellules ILC1 et cellules NK) dépendent du facteur de transcription T-bet (Bernink et al., 2013). Elles sont caractérisées par leur capacité à produire des cytokines associées aux profils Th1 ou Th17 (respectivement, T-helper cells 1 et 17), notamment de l'IFN- $\gamma$ . Les ILCs du groupe 2 (ILC2) dépendent du facteur de transcription GATA3 (GATA binding protein 3) et ROR $\alpha$  (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor) pour leur maturation et produisent des cytokines associées au profil Th2, notamment l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 (Hoyler et al., 2012; Moro et al., 2010). Les ILCs du groupe 3 (ILC3 et LTi-like ou Lymphoid Tissue-inducer) dépendent du facteur de transcription ROR $\gamma$ t mais également de l'IL-7 pour leur maturation (ou différenciation) et produisent de l'IL-17, de IL-22 et IL-23 (Spits et al., 2013). Les ILCs sont impliquées dans la protection des

muqueuses contre les infections bactériennes, parasitaires, virales et fongiques (Goldberg et al., 2015).

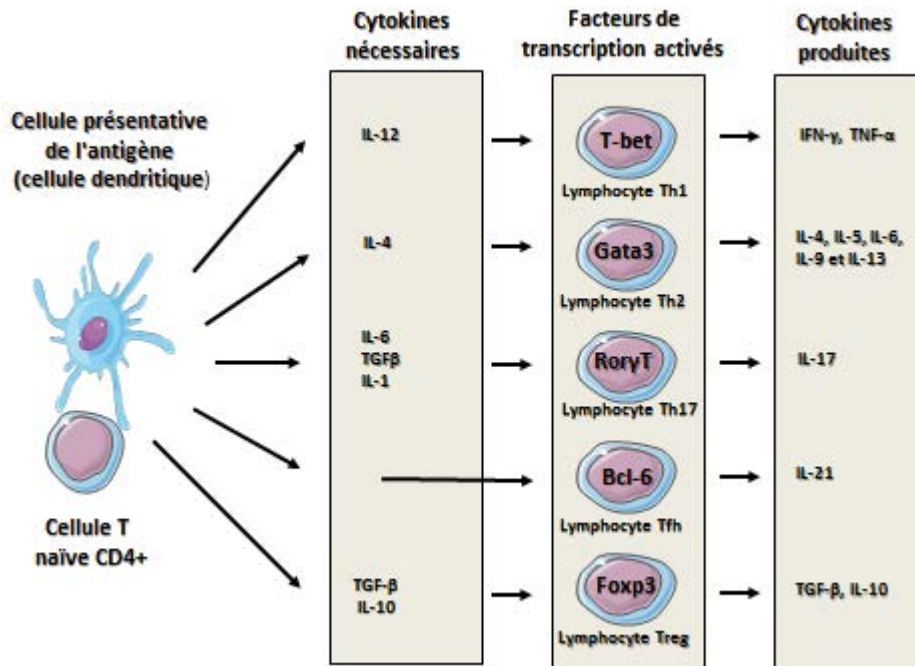
Les ILCs ont un rôle important dans les réponses immunes au niveau des muqueuses, interagissant notamment avec le microbiote. Elles participent au maintien de la tolérance et peuvent répondre rapidement aux infections et aux dommages tissulaires. Elles ont donc un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie et le contrôle de la barrière intestinale. Leur activation chronique peut néanmoins conduire à une inflammation chronique et de ce fait participer au développement des MICI (Peters et al., 2016).

### **Les cellules présentatrices d'antigènes (APCs)**

Les APCs sont des cellules capables de capturer, transporter et présenter des peptides antigéniques associées aux molécules du CMH de classe II à des cellules T auxiliaires (telles que Th1 ou Th2). Les APCs professionnelles (principalement les DCs, mais également les macrophages et les lymphocytes B) sont également capables de délivrer des signaux de co-stimulation tels que l'activation de récepteurs cellulaires ou la production de cytokines, notamment suite à l'activation par des PRRs, ce qui va jouer un rôle essentiel dans l'initiation et la modulation des réponses induites par les lymphocytes T. Ces cellules existent normalement dans un état tolérogène et sont essentielles au maintien de l'homéostasie (Geremia et al., 2014).

### **Les cellules dendritiques (DCs)**

Les DCs sont des APCs qui du fait de leur grande capacité migratrice, vont transporter les antigènes des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques mésentériques et les plaques de Peyer, afin de présenter des antigènes aux lymphocytes T (Voedisch et al., 2009). Ils représentent le lien entre l'immunité innée et adaptative en régulant la réponse immunitaire innée et par la production des cytokines qui peuvent recruter les autres cellules immunitaires et orienter la réponse immunitaire vers des réponses de type régulatrice, Th1, Th2 ou Th17 (Figure 8)



**Figure 8: Polarisation des lymphocytes T naïfs après interaction avec les cellules dendritiques**

Les DCs représentent une population hétérogène de cellules différant sur le plan phénotypique et fonctionnel, comprenant notamment les DCs conventionnelles (cDCs) CD11c<sup>+</sup> CD123<sup>low</sup> et les DCs plasmacytoides (pDCs) CD11c<sup>low</sup> CD123<sup>high</sup> présentes à l'état basal dérivant d'un même progéniteur hématopoïétique (DCP, common-Dendritic Cell Progenitor) et les DCs qui dérivent des monocytes (MoDC), recrutées en cas d'inflammation (Merad et al., 2013). Les cDC sont celles qui sont considérées comme les APC professionnelles, capables de sécréter de l'IL-12 et d'exprimer des molécules de co-stimulation et de ce fait d'activer les lymphocytes T. On distingue deux sous-populations de cDC, cDC1 et cDC2. Les cDC1 (CD8 $\alpha$  ou CD103<sup>+</sup>) expriment le TLR3, le CD24 et CXR1 et ont une forte capacité à sécréter de l'IL-12, conduisant ainsi à la polarisation des Th1. Les cDC2 n'expriment ni CD103 ni CD8 $\alpha$  et sont caractérisées par l'expression de l'intégrine CD11b et de SIRPa (ou CD127a). Elles prédominent dans les tissus et sont plus efficaces dans l'interaction avec les cellules T CD4<sup>+</sup>, notamment Th2 et Th17. Elles restent cependant difficilement distinguables des macrophages, mais de nouveaux marqueurs ont récemment été décrits permettant d'améliorer leur discrimination. Les pDC se caractérisent par le marqueur BDCA-2 (ou siglec-H chez la souris) et ont une grande capacité à produire de l'interféron  $\alpha$ , en cas d'infection virale (Reizis et al., 2011). On trouve également des DCs particulières au niveau de la peau (cellules de Langerhans). Les DCs sont recrutées grâce à la libération de diverses chimiokines selon le type de cellules, tels que le GM-CSF

(Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), MIP-3 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-3 $\alpha$ ) ou CCL-20. Le GM-CSF est un facteur de croissance impliqué dans la différenciation des précurseurs hématopoïétiques et permet la différenciation de DCs *in vitro* à partir de monocytes murins ou humains ou de cellules précurseur isolées de moelle osseuse. Le MCSF est aussi crucial pour le développement des DCs ainsi que le Flt3-L (Fms-Like tyrosine 3-Ligand).

### **Les cellules Natural Killer (NKs)**

Les NKs sont des acteurs essentiels dans la réponse immunitaire innée. Elles sont spécialisées dans la lyse des cellules infectées par des virus et des cellules cancéreuses. Elles sont capables d'activer les macrophages et de stimuler la maturation des DCs par la production de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , permettant de tuer les cellules infectées.

### **1.5.2. Immunité adaptative**

La réponse innée permet d'éliminer 99,9% des agents pathogènes causant l'infection mais pour les 0,1% restant, l'immunité adaptative est nécessaire. Contrairement à l'immunité innée, le système immunitaire adaptatif développe des réponses spécifiques aux antigènes faisant intervenir la mémoire immunitaire contre cet antigène et cette réponse peut prendre quelques jours pour sa mise en place.

Les lymphocytes T, cellules clé de l'immunité adaptative, reconnaissent les antigènes présentés sous forme de peptides antigéniques au niveau de leur récepteur T spécifique (TCR) associés aux molécules du CMH et se distinguent en deux classes en fonction de la molécule accessoire qu'ils expriment. Pour générer des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, les DC présentent l'Ag peptidique associé à une molécule CMH de classe I. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (lymphocytes T auxiliaires ou T helper Th) reconnaissent généralement des antigènes apprêtés par les molécules du CMH de classe II. Leur différenciation et leur prolifération constituent une étape cruciale pour la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace. Leur activation se fait grâce à 3 signaux qui vont orienter différemment leur polarisation en lymphocytes T effecteurs (Th1, Th2, Th17) ou régulateurs (Treg):

- 1) la reconnaissance de l'antigène par le récepteur T,
- 2) l'expression de molécules de co-stimulation par l'APC (tels que CD40, CD80 et CD86) et
- 3) l'environnement cytokinique (Choy et al., 2017; Kapsenberg, 2003; Pulendran et al., 2008) (Figure 8).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th1 sont activés principalement par la présentation d'antigènes d'agents infectieux tels que les bactéries, virus et champignons, induisant ainsi la libération des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$  qui conduisent à l'activation des facteurs de transcription comme T-bet (Raphael et al., 2015). Les cytokines caractéristiques sécrétées par les cellules Th1 activées sont l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-12 (Raphael et al., 2015). L'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th2 est principalement induite par la sécrétion d'IL-4, qui conduit à l'activation de STAT6, et à l'activation d'un facteur de transcription GATA3 (Kmieć et al., 2017; Raphael et al., 2015). Les cytokines caractéristiques libérées par les cellules Th2 sont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, l'IL-21 et l'IL-25. Les Th2 vont favoriser la production d'anticorps de type IgE par les lymphocytes B et l'activation d'autres cellules immunitaires impliquées dans la réaction allergique. La réponse Th17 se produit en absence d'IL-4 et d'IL-12 et en présence d'IL-6, d'IL-23, d'IL-1 $\beta$  et de TGF- $\beta$  (Jäger and Kuchroo, 2010). Elle est médiée par l'activation de STAT3, et se caractérise par la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 sont associés à des pathologies auto-immunes et inflammatoires (dont la maladie de Crohn) mais jouent également un rôle crucial dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes ainsi que dans la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th22 sont polarisés suite à l'activation de STAT3 par l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , et sont une source majeure d'IL-22 et produisent également de l'IL-13, mais pas d'IL-17, contrairement au Th17. Leur rôle reste mal connu, mais ils sont impliqués dans la pathogénèse de désordres auto-immuns et inflammatoires, notamment d'allergies cutanées. Des travaux contradictoires indiquent également que ces cellules peuvent exercer des activités anti-inflammatoires, notamment dans les allergies respiratoires (Tamasauskiene and Sitkauskiene, 2018). Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont impliqués dans les réponses immunosuppressives permettant le maintien de la tolérance et le contrôle de la réponse immunitaire en régulant la fonction des cellules T effectrices Th1, Th2 et Th17. Ils contrôlent également la maturation des DCs par la libération de cytokines immunosuppressives tels que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  permettant ainsi le contrôle des réponses inflammatoires et le maintien de l'homéostasie intestinale. Il joue un rôle important dans la prévention des réponses anormales vis-à-vis du microbiote intestinal. Les lymphocytes T régulateurs représentent une population hétérogène, séparée en 2 groupes en fonction de leur ontogénie, les Treg d'origine thymique ou Treg naturels (nTreg CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) et les Treg inductibles (Tr1 ou Th3) qui se développent à partir des cellules CD4<sup>+</sup> en périphérie. Les nTreg sont caractérisés par une forte expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (IL-2R ou CD25) et du facteur de transcription FoxP3 qui est essentiel pour le développement et la fonction des cellules Treg (Lu et al., 2017). Les Treg FoxP3<sup>+</sup> sont des cellules très plastiques qui peuvent s'adapter à l'environnement et exprimer des facteurs spécifiques d'autres populations cellulaires, tel que T-bet ou Stat3. Une petite proportion peut exprimer ROR $\gamma$ t et produire de l'IL-17 tout en conservant leur propriété

immunosuppressive. Les Tr1 d'origine extra-thymique produisent de grande quantité d'IL-10 et sont capables d'inhiber l'inflammasome (Yao et al., 2015), alors que les Th3 se caractérisent par leur capacité à produire du TGF $\beta$ .

Les lymphocytes B se différencient au niveau de la moëlle osseuse à partir d'un progéniteur lymphocytaire commun (CLP). Après maturation elles vont exprimer leur récepteur spécifique (BCR) qui tout comme le TCR, leur permettront de reconnaître des antigènes spécifiques, de s'activer et faire ainsi face à des réarrangements de gènes permettant d'augmenter la diversité des immunoglobulines (Ig) et de se différencier en plasmocytes, cellules capables de sécréter différentes classes d'anticorps ou immunoglobulines (IgM, IgG, IgD et IgA) impliqués dans la réponse humorale spécifique. Les lymphocytes B intestinales se différencient en cellules plasmiques sécrétant principalement des IgA (Cerutti, 2008; Cerutti and Rescigno, 2008). Les IgA sont les anticorps les plus abondamment produits dans le corps humain et représentent 75% des Ig de la muqueuse intestinale. Ils permettent de contrôler la colonisation microbienne et la composition du microbiote ainsi que l'inhibition de la pénétration des antigènes nocifs à travers la barrière épithéliale (Brandtzaeg, 2007; Corthésy, 2010). La majorité des plasmocytes intestinaux à IgA proviennent de plasmocytes sensibilisés au niveau des plaques de Peyer. Les IgA interagissent ensuite avec le récepteur aux immunoglobulines polymériques à la surface basolatérale des cellules épithéliales et sont ensuite transportées vers la face apicale dans la lumière sous forme de dimère associé à une pièce sécrétoire (IgA sécrétoire, sIgA) (Kaetzel, 2005) qui confère aux sIgA une protection contre les enzymes protéolytiques. Les sIgA bloquent les bactéries et virus pathogènes et les toxines en reconnaissant des épitopes spécifiques et favorise ainsi leur phagocytose (Pabst, 2012). Les DCs peuvent échantillonner des bactéries du microbiote et induire la production d'IgA spécifiques par les cellules B, limitant ainsi la pénétration de ces bactéries au travers de l'épithélium (Hooper and Macpherson, 2010). Ils aident à limiter l'inflammation qui peut résulter de la grande charge bactérienne dans la lumière intestinale. De plus, l'IL-10 produite par les lymphocytes B «régulateurs» est importante pour générer des cellules Treg muqueuses et prévenir les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires (Amu et al., 2010; Tadmor et al., 2011). De même, ces cellules produisant également du TGF- $\beta$  peuvent jouer un rôle important dans la prévention des réponses inappropriées aux allergènes alimentaires (Lee et al., 2011; Liu et al., 2013).

## **Chapitre 2 : Les maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICIs)**

### **2.1. Généralités**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICIs) sont caractérisées par la présence de lésions inflammatoires pouvant toucher tout ou une partie du tube digestif. Les MICIs peuvent survenir à tout âge mais elles touchent plus fréquemment des personnes relativement jeunes ayant entre 20 et 40 ans. La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont les deux principales formes de MICI. L'étiologie des MICI est encore inconnue mais les études récentes indiquent que ces maladies inflammatoires chroniques sont multifactorielles. Des facteurs génétiques, environnementaux et microbiologiques peuvent être les causes principales des MICIs. Les MICI sont des pathologies idiopathiques chez les individus génétiquement prédisposés, mettant en cause un déséquilibre du système immunitaire et une composition modifiée du microbiote, également connu sous le nom de dysbiose.

### **2.2. Epidémiologie des MICIs**

La fréquence des MICIs a augmenté en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord ces dernières décennies (Loftus, 2004; Munkholm et al., 1992). Cette augmentation pourrait être liée à une plus grande sensibilisation, à une meilleure connaissance des maladies et une amélioration de leur enregistrement au niveau mondial. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acceptation de l'endoscopie comme principale procédure diagnostique au niveau international est assez récente, permettant de diviser l'historique en une période pré-endoscopique avant 1970, une période endoscopique précoce entre 1970 et 1990, caractérisée par une grande hétérogénéité entre les études, et une période post-endoscopique depuis 1990 environ. Cette dernière période a permis une distribution généralisée des équipements et des compétences en endoscopie et de ce fait a contribué à harmoniser les procédures de diagnostic entre tous les pays. Depuis lors, la plupart des études internationales ont été réalisées selon des définitions et des critères de diagnostic communs (Lennard-Jones, 1989). L'incidence annuelle de la RCH varie de 0 à 19,2 pour 100.000 en Amérique du Nord et de 0,6 à 24,3 pour 100.000 en Europe, ce qui correspond à une prévalence de 37,5 à 248,6 pour 100 000 et de 4,9 à 505 pour 100 000 respectivement. La MC est similaire (0-20,2 pour 100 000 en Amérique du Nord, 0,3-12,7 pour 100 000 en Europe).

Dans une zone géographique définie, les taux d'incidence restent hétérogènes. Au Canada, un gradient Est-Ouest a été démontré au niveau national (Bernstein et al., 2006). Un registre

basé sur la population du Manitoba au Canada a en effet démontré que les taux d'incidence des MICIs sont parmi les plus élevés au monde (Bernstein et al., 2006). En Europe, de grandes différences ont été signalées en ce qui concerne la variation de la fréquence des MICIs entre les pays et leurs régions. Les taux d'incidence les plus élevés du nord et du sud de l'Europe ont été observés respectivement dans les îles d'Islande et des îles Féroé et dans les îles de Crète, de Sicile et de Majorque (Baumgart, 2017). En Grèce, la Crète a montré une incidence nettement plus élevée de MICI par rapport à Joannina dans le Nord (Baumgart, 2017). Une incidence similaire en Sicile par rapport au Nord de l'Italie a été rapportée (Baumgart, 2017). En France, une incidence et une prévalence plus élevées dans le Nord ont été signalées (Nerich et al., 2006). Dans les pays considérés comme ayant une incidence élevée de MICI, certaines populations présentent une incidence nettement réduite par rapport à la population générale (Bernstein et al., 2011). L'incidence des MICIs peut varier selon les ethnies, suggérant un rôle des facteurs génétiques et environnementaux (Heresbach et al., 1998; Kurata et al., 1992; Victoria et al., 2009).

Les pays en développement signalent de façon générale une plus faible prévalence des MICIs, qui cependant semble augmenter dans plusieurs pays, telles que l'Inde et la Chine, en parallèle à leur industrialisation (Desai and Gupte, 2005; Zheng et al., 2005). De plus, des études ont démontré que les personnes qui immigrerent d'une région à faible prévalence vers une région ayant une prévalence plus élevée, pourraient présenter un risque accru de développer une MICI, en particulier chez les enfants de première et deuxième génération (Bernstein and Shanahan, 2008; Desai and Gupte, 2005).

Au Liban, une prévalence en fonction de l'âge montre de 53,1 pour 100 000 personnes pour la MC et de 106,2 pour 100 000 pour la RCH. L'incidence annuelle moyenne était de 4,1 pour 100 000 personnes pour la RCH et de 1,4 pour 100 000 personnes pour la MC. La prévalence libanaise des MICIs se situe au niveau intermédiaire en comparaison avec les populations européennes et d'Amérique du Nord (Abdul-Baki et al., 2007).

### **2.3. Diagnostique et symptômes**

Comme il n'existe pas de marqueur pathologique spécifique des MICI, le diagnostic recommandé pour la MC et la RCH est principalement basé sur l'évaluation clinique, les résultats de laboratoire et les antécédents médicaux et ils sont confirmés par des tests microbiologiques, une endoscopie et des tests histologiques. Plusieurs maladies présentant des symptômes similaires doivent être exclues. Les patients suspectés d'être atteints de MICI sont soumis à des tests invasifs standard, détectant que la majorité d'entre eux souffrent du syndrome du côlon irritable (IBS) (Dubinsky et al., 2002). La différence entre IBS et les autres formes de MICI est que l'IBS ne présente pas d'inflammation, d'ulcères ou de dommages organiques au niveau du tractus gastro-intestinal. Le diagnostic de l'IBS est basé



sur les symptômes et l'évaluation des anomalies organiques. Il n'est donc pas facile, du fait de l'hétérogénéité des symptômes, de la localisation et de la gravité de la maladie, d'établir facilement un diagnostic. La diarrhée, les douleurs abdominales et / ou la perte de poids sont les principaux symptômes de la MC. Dans la RCH, la diarrhée sanglante est le symptôme primaire, mais elle peut être aussi présente dans la MC. Les patients atteints de RCH peuvent également présenter des symptômes tels que des saignements rectaux. Le passage du mucus et de pus est plus fréquent chez les patients atteints de RCH alors que des symptômes de malaise, une perte d'appétit et/ou de la fièvre sont fréquents chez les MC, mais peuvent être un signe d'attaque sévère chez les RCH. Les fistules sont fréquentes chez les MC mais peuvent survenir dans les RCH. De plus, plusieurs symptômes associés à la constipation sont décrits par les patients atteints de RCH. Les manifestations extra-intestinales courantes dans les MICIs sont des anomalies du système musculo-squelettique (Dignass et al., 2012; Stange et al., 2008, 2006; Van Assche et al., 2010).

Initialement, plusieurs analyses de sang sont réalisées comprenant un hémogramme, le dosage de l'urée sérique, de la créatinine, des électrolytes, des enzymes hépatiques, du fer sérique et la protéine C-réactive (CRP) (Dignass et al., 2012; Stange et al., 2008, 2006; Van Assche et al., 2010). Dans les cas de MICIs, l'hémogramme peut révéler une anémie due à un saignement rectal chronique ou une thrombocytose résultant d'une réponse inflammatoire chronique. La concentration de la CRP pourrait augmenter à la suite d'une inflammation chronique. Un profil métabolique de base peut démontrer une perturbation au niveau des électrolytes due à une diarrhée persistante (Dignass et al., 2012; Stange et al., 2008, 2006; Van Assche et al., 2010).

Le biomarqueur sérologique le plus robuste de la MC est l'anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Les anticorps cytoplasmiques anti-neutrophiles péri-nucléaires (pANCA) sont aussi considérés comme de bons marqueurs. Le pANCA et les ASCA sont utilisés comme test de confirmation lors d'un dépistage des MICIs puisqu'ils peuvent différencier entre la MC et la RCH. Les pANCA sont détectés chez la moitié des patients atteints de RCH (Stange et al., 2008, 2006). De même, l'ASCA peut être détectée chez 35 à 50% des patients atteints de MC et chez moins de 1% des patients atteints de RCH (Nikolaus and Schreiber, 2007). La spécificité de l'ASCA chez la MC et des pANCA chez la RCH est plutôt élevée, avec respectivement 89-97% et 89% (Nikolaus and Schreiber, 2007). Des études rapportent que la CRP est un marqueur qui a une sensibilité de 70 à 100% chez la MC et de 50 à 60% pour la RCH (Vermeire et al., 2006). Des tests microbiologiques sont recommandés pour exclure les diarrhées d'origine infectieuse causées par des pathogènes courants, incluant des tests spécifiques pour détecter la toxine de *Clostridium difficile* et de *E. coli* 0157: H7 (Dignass et al., 2012; Stange et al., 2008, 2006; Van Assche et al., 2010). La calprotectine est un marqueur fécal qui indique la migration des leucocytes vers le tractus gastro-intestinal. C'est

un marqueur sensible de l'inflammation dans le tractus gastro-intestinal. En outre, il peut différencier entre le syndrome du côlon irritable et les MICI. De plus, la calprotectine peut être utilisée pour mesurer l'activité de la maladie et prédire la rechute de la MC (Jahnsen et al., 2009). Néanmoins, plusieurs autres conditions comme le cancer et les infections peuvent donner un test positif à la calprotectine (Vermeire et al., 2006).

L'endoscopie est utilisée pour véritablement établir le diagnostic et l'évolution de la RCH et de la MC. Les types d'endoscopie sont la proctosigmoïdoscopie pour le rectum, la coloscopie pour le gros intestin et le côlon inférieur et l'iléoscopie pour le côlon jusqu'à l'iléon. Une coloscopie ou une iléoscopie avec biopsie sont recommandées pour l'examen d'un patient souffrant de MICI. L'aspect endoscopique comme la distribution et la forme des lésions différencie la MC et la RCH dans la plupart des cas (Vermeire et al., 2006). La RCH se caractérise par une inflammation des muqueuses et affecte exclusivement le rectum et le colon avec des lésions superficielles d'une façon continue. La MC quant à elle peut toucher n'importe quelle partie du tractus gastro-intestinal avec une prédilection pour la région iléo-caecale et les lésions sont transmurales de façon non continue, évoluant vers des ulcérations profondes pouvant entraîner le développement de fistules, d'abcès et de sténoses. Concernant l'histologie, la présence de granulome, d'inflammation focale ou d'anomalies architecturales trouvées dans les biopsies est une caractéristique principale de la MC. Les caractéristiques de la RCH sont l'irrégularité diffuse des cryptes et la réduction de leur nombre et les polymorphismes généraux de l'épithélium cryptique (Stange et al., 2008, 2006).

## **2.4. Recommandations thérapeutiques des MICIs**

Le traitement varie selon le type de MICI ainsi que sa distribution et sa gravité. Bien que la chirurgie soit indiquée dans certaines situations, la pharmacothérapie est l'approche de choix pour induire une rémission et ensuite prévenir les rechutes. Concernant la MC, il n'existe actuellement aucun remède médical ou chirurgical efficace. La proctocolectomie permet d'obtenir une guérison pour la RCH, mais une telle chirurgie extensive n'est habituellement offerte qu'en cas d'échec du traitement médicamenteux ou de dysplasie. Les objectifs principaux du traitement médical des MICIs sont généralement limités à la suppression de la réponse inflammatoire permettant une rémission de la maladie. Les médicaments dans le traitement des MICIs peuvent être utilisés par voie topique, orale ou intraveineuse. Les médicaments couramment utilisés comprennent les aminosalicylates, les corticostéroïdes, les antibiotiques et les agents immunomodulateurs (Robinson, 1998; Sartor, 2000).

### **Aminosalicylates**

La sulfasalazine est constituée du composant actif mésalazine (acide 5-aminosalicylique, 5-ASA) et de la sulfapyridine réunis par une liaison azoïque. La sulfasalazine reste inactive dans le tractus gastro-intestinal proximal, mais dans le côlon, le clivage bactérien de la liaison azoïque se produit, rendant le 5-ASA disponible uniquement pour la muqueuse intestinale. Les aminosalicylates sont utilisés dans le traitement de la RCH légère et/ou modérée et de la MC modérément active, ainsi que dans le maintien de la rémission (Ewe et al., 1996).

### **Corticostéroïdes**

Les corticostéroïdes bloquent la production ainsi que les effets des cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires. Les corticostéroïdes sont efficaces dans les cas des RCH et des MC aiguës, mais pas en traitement de maintenance à long terme en raison de l'absence d'effet et du développement d'effets secondaires (Adcock, 2004; Klotz and Schwab, 2005).

### **Antibiotiques**

Les antibiotiques sont utilisés par les cliniciens depuis de nombreuses années. Ils peuvent sélectivement diminuer l'invasion des tissus par les micro-organismes et éliminer les espèces bactériennes agressives ou diminuer globalement les concentrations bactériennes lumenales et muqueuses, en fonction de leur spectre d'activité. Les antibiotiques utilisés dans les deux types de MICI, MC active et RCH, sont la clarithromycine, la ciprofloxacine, le métronidazole, la vancomycine et l'imipénème. Dans quelques cas, ces antibiotiques sont utilisés pour maintenir la rémission. Par contre, il semble avoir un impact peu significatif sur l'évolution clinique ainsi que sur les paramètres de l'activité inflammatoire chez les patients atteints de RCH (Hoentjen et al., 2003; Sartor, 2004; West et al., 2004).

### **Agents immunomodulateurs**

L'azathioprine, qui sera métabolisé en 6-mercaptopurine, le méthotrexate et la cyclosporine sont les quatre principaux agents immunomodulateurs utilisés chez les patients atteints des MICIs. Ces médicaments modifient la réponse immunitaire en inhibant les réponses induites par les lymphocytes T et la production de cytokines. Ces immunosuppresseurs sont des médicaments valables pour toutes les formes de MICI qui ne répondent pas à d'autres formes de traitement.

### **Thérapie biologique pour les MICI**

Des nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des MICIs sont en train d'émerger. Ceux-ci utilisent souvent des agents biologiques qui ciblent physiologiquement les voies inflammatoires individuelles. Les agents biologiques qui ont déjà montré leur

efficacité contre la MC et récemment contre la RCH comprennent les anticorps monoclonaux dirigés contre le facteur de nécrose tumorale alpha (anti-TNF- $\alpha$ ) (Infliximab) et la molécule d'adhésion leucocytaire  $\alpha$ -4 intégrine (natalizumab) (D'Haens and Hlavaty, 2004; Kohn et al., 2004; Kurtovic and Segal, 2004). Cependant ces médicaments sont extrêmement coûteux (19 000 \$ par mois au États-Unis).

Même s'il n'existe pas encore de traitement pour guérir complètement des MICI, les traitements actuels permettent le plus souvent d'éliminer les symptômes sur de longues périodes. Cependant ils présentent de nombreux effets indésirables secondaires et un tiers des patients présentent des récives fréquentes. L'intervention chirurgicale devient dans certains cas nécessaire mais ne met pas non plus à l'abri des récives postopératoires. Des traitements alternatifs, notamment basés sur des produits plus naturels représentent donc une alternative intéressante.

## **2.5. Facteurs influençant l'apparition des MICI**

### **2.5.1. Facteurs environnementaux**

Les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans la pathogénèse des MICIs. Des nombreuses études ont montré la relation entre les MICIs et les facteurs environnementaux tel que le tabagisme, les régimes alimentaires, la vitamine D, la prise de médicaments, les infections entériques, le contexte géographique, le stress social et les facteurs psychologiques (Ananthakrishnan, 2015; Loftus, 2004; Zhang and Li, 2014).

Parmi tous ces facteurs, le tabagisme demeure le facteur environnemental le plus étudié et reproductible pour les MICIs, avec des effets différents sur la MC et la RCH (Regueiro et al., 2005). Le tabagisme est généralement accepté comme facteur de risque de la MC, aggravant la physiopathologie de la maladie. Il peut ainsi réduire la réponse au traitement et augmente le taux de rechute ainsi que le risque de complications (Solberg et al., 2007). Une méta-analyse a rapporté les preuves d'une association entre le tabagisme et la MC (OR 1.76). Dans le cas des RCH, le tabagisme, à l'inverse, a un effet protecteur (OR 0,58) contre les mêmes conséquences de la maladie (Höie et al., 2007). Ces résultats ont confirmé que le tabagisme est un facteur environnemental important dans les MICIs.

La plupart des études épidémiologiques concernant le rôle de l'alimentation dans les MICIs se sont concentrées sur les macronutriments (Chapman-Kiddell et al., 2010; Hou et al., 2011). Une consommation élevée de fibres, en particulier de fibres provenant de fruits et de légumes, serait associée à une réduction significative du risque de MC (Amre et al., 2007; Ananthakrishnan et al., 2013). Cette association n'est pas observée avec les céréales ou les graines. Plusieurs mécanismes potentiels pourraient expliquer une association inverse avec

les fibres. Les fibres solubles (provenant de fruits et de légumes) sont métabolisées par les bactéries intestinales en acides gras à chaîne courte (AGCC) qui inhibent la transcription des médiateurs pro-inflammatoires (Galvez et al., 2005). De plus, les AGCCs aident à maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale et réduisent la translocation des bactéries commensales incluant *E. coli*. Les acides gras poly insaturés à chaîne longue sont également associés à une réduction du risque de la RCH (Ananthakrishnan et al., 2014). A l'inverse, une étude menée auprès de femmes françaises d'âge moyen a montré qu'une forte consommation de protéines de viande et de poisson est associée à une augmentation de risque de MICI (Jantchou et al., 2010).

La relation entre l'acquisition des MICIs et les micronutriments reste mal connue. Le rôle immunologique des micronutriments tel que la vitamine D est de plus en plus mis en évidence (Garg et al., 2012). Des données émergentes suggèrent que la vitamine D pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse et l'évolution des MICIs (Cantorna et al., 2004). Leslie *et al.*, ont découvert qu'une déficience en vitamine D était fréquente chez les patients atteints de MICI et ont souligné qu'une faible teneur en vitamine D contribuerait à l'augmentation du risque de MICI (Leslie et al., 2008). Chez les souris, la déficience en vitamine D ou en récepteur de la vitamine D (VDR) est associée à une augmentation de la sensibilité à la colite induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) et l'administration de Vitamine D (1 $\alpha$ ,25-DihydroxyvitamineD3) réduit la gravité de l'inflammation intestinale (Ananthakrishnan et al., 2012; Cantorna et al., 2000; Froicu et al., 2006).

L'appendicectomie est un facteur qui peut contribuer au développement des MICIs (López Ramos et al., 2001). Une association significative avec l'appendicectomie a été trouvée chez les patients atteints de RCH. Cette association s'élevait lorsque l'opération était réalisée avant l'âge de 20 ans. Aucune association n'a été trouvée pour la MC (López Ramos et al., 2001). D'autres facteurs tels que les infections entériques, l'exposition aux antibiotiques et les traitements anti-inflammatoires sont associés à une augmentation des risques et des rechutes des MICIs (Ananthakrishnan, 2013; Ananthakrishnan et al., 2012; Hashash et al., 2015; Mylonaki et al., 2004).

Le stress a longtemps été proposé comme un facteur jouant un rôle dans la pathogenèse des MC et des RCH (Maunder, 2005; Mawdsley and Rampton, 2006). Bitton *et al.* ont suggéré que les personnes ayant des niveaux de stress plus faibles avaient un risque réduit d'apparition de la maladie (Bitton et al., 2008). Les traitements visant à limiter la dépression et l'anxiété, semblent améliorer les symptômes des MICIs (Cámara et al., 2011).

D'autre part, des données écologiques et épidémiologiques récentes suggèrent que la pollution de l'air peut contribuer au risque de MC et de RCH. Une augmentation de l'incidence de la MC et de le RCH dans les pays en développement a été remarqué (Thia et al., 2008).

### 2.5.2. Facteurs génétiques

Les facteurs génétiques jouent un rôle clé dans la prédisposition aux MICIs et peuvent influencer le comportement et la sévérité de la maladie. Selon l'étude de Halme *et al.*, 5 à 10% des MICIs sont associées à des facteurs génétiques, tandis que pour le reste des cas, les MICI se développent à cause de facteurs extrinsèques (Halme et al., 2006). De façon très intéressante, les taux d'acquisition de la MC sont très comparables chez les vrais jumeaux (50-75%) alors que concordance phénotypique l'est beaucoup moins dans la RCH (10 -20%), ce qui suggère que l'héritabilité est moins importante pour la RCH que pour la MC et que d'autres facteurs non-génétiques pourraient jouer un rôle important dans la RCH. Une méta-analyse d'étude d'association sur le génome entier (Genome-Wide Association Study ou GWAS) a identifié 163 loci conférant une susceptibilité à la MICI. Sur les 163 loci identifiés dans la population caucasienne, 110 semblent être pertinents à la fois pour la MC et pour la RCH alors que 23 loci semblent être spécifiquement liés à la RCH et 30 loci à la MC (Jostins et al., 2012). D'autre part, 113 des 163 loci sont communs avec d'autres maladies chroniques, telles que des maladies auto-immunes (Jostins et al., 2012; Kurtovic and Segal, 2004; Zhernakova et al., 2009). Cependant, ils ne représentent qu'environ 25% du risque d'héritabilité estimé pour la MC et 16% pour la RCH. Les MICI se manifestent pendant l'enfance ou l'adolescence chez 15 à 20% des patients (Henderson et al., 2011). Deux GWAS réalisées exclusivement dans ce groupe d'âge ont montré des similitudes génétiques entre les jeunes patients et les adultes (Imielinski et al., 2009; Kugathasan et al., 2008). Le système immunitaire inné et adaptatif joue un rôle primordial dans la pathogenèse des MICIs. Des mutations dans les gènes impliqués dans les voies régulatrices telles que celui de l'IL-10 et ceux impliqués dans la fonction des cellules épithéliales intestinales telles que l'*ecm1* et l'*herc2* (ligase E3 ubiquitine) sont fréquemment retrouvées pour la RCH, tandis que les polymorphismes des gènes impliqués dans l'autophagie et de la reconnaissance des antigènes semblent être fréquemment retrouvées dans la MC (Kaser et al., 2010). De nombreux gènes associés aux MICIs semblent être impliqués dans la différenciation des lymphocytes T (par exemple les gènes qui codent les cytokines IL-21, IFN- $\gamma$  et le récepteur des cytokines IL-7). Certains d'entre eux sont plus spécifiquement associés à la voie de l'IL-23 (*il23r*, *jak2*, *stat3*, *il12b* et *ptpn2*), ou dans le maintien des cellules Th17 (Duerr et al., 2006). Les cellules Th17 sont considérées comme essentielles pour coordonner la défense

contre des pathogènes spécifiques et pour le développement de l'inflammation (Bettelli et al., 2008). De plus, les gènes de signalisation du TNF (*tnfrsf9*, *tnfrsf14* et *tnfrsf15*) sont également fréquemment associés aux MICIs. Ces gènes codent pour des protéines ayant divers effets immunitaires, incluant la propagation de l'inflammation systémique et l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Cho and Brant, 2011; Khor et al., 2011). Une autre voie importante pour le développement du processus inflammatoire est l'adhésion rapide ainsi que la localisation des leucocytes à la muqueuse intestinale (Thomas and Baumgart, 2012). Dans ce contexte deux gènes peuvent être responsables dans la progression de l'inflammation des MICIs, *ccr6* et *cxc5*, qui codent pour des récepteurs de chimiokines probablement impliqués dans le recrutement des leucocytes (Thomas and Baumgart, 2012).

### **Polymorphismes dans le gène *nod2***

En 2001, deux groupes de recherche indépendants ont identifié le premier gène de susceptibilité de la MC, le gène *card15/nod2*, dans le locus IBD1 présent sur le chromosome 16 (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Hugot *et al.* ont trouvé des associations indépendantes entre la MC et trois polymorphismes différents dans le gène codant le récepteur de l'immunité inné NOD2. Ces mutations sont localisées au sein ou à proximité de la région LRR responsable de la reconnaissance des motifs microbiens conservés provoquant une perte de fonction de la protéine (Hugot et al., 2001). Ces trois variants comprennent une mutation causée par l'insertion d'une cytosine dans le cadre de lecture de la Leu1007 (Leu1007fi nsC), qui provoque un transcrit protéique tronqué et un changement du cadre de lecture lors de la traduction, résultant de deux substitutions en acides aminés (Arg702Trp et Gly908Arg). La transmission d'une copie des allèles de risque (Leu1007fi nsC, Arg702Trp et Gly908Arg) confère un risque modeste de développement de MC (un risque relatif de 3 fois). Cependant, une mutation qui se trouve sur les deux allèles (homozygote) est associée à un risque de 20 à 40 fois supérieur. La prévalence des trois principaux polymorphismes (Leu1007fi nsC, Arg702Trp et Gly908Arg) varie entre les populations, à la fois chez les sujets sains ainsi que chez les individus atteints de MC (Bonnen and Cho, 2003; Riis et al., 2007).

Les taux de prévalence les plus élevés ont été signalés dans certaines régions de l'Europe et des États-Unis, avec 40% des patients ayant la MC portant au moins un des polymorphismes. D'autre part, des taux de mutation plus faibles ont été signalés en Europe du Nord tandis que les mutations *nod2* semblent presque absentes dans les pays asiatiques tels que le Japon, la Corée et la Chine (Bonnen and Cho, 2003; Cooney and Jewell, 2009).

## **Polymorphismes dans les gènes d'autophagie**

Les analyses GWAS ont permis de mettre en évidence le rôle de l'autophagie dans le développement des MICIs. Notamment, deux gènes majeurs, *atg16l1* et *irgm* jouent un rôle important dans la pathogenèse de la MC. L'autophagie est un processus physiologique impliqué dans l'homéostasie intracellulaire contribuant à la dégradation et au recyclage du contenu cytosolique et des organites. Elle joue aussi un rôle prépondérant dans la résistance contre les infections en participant à l'élimination des microorganismes intracellulaires. Le facteur ATG16L1 est essentiel pour le processus d'autophagie, et de nombreuses études ont montré que la mutation codante T300A est associée à un risque accru de MC (Hampe et al., 2007).

Une étude de GWAS chez des sujets coréens et japonais a permis d'identifier un certain nombre de gènes pouvant être en association avec la MC, qui ne sont pas impliqués dans les populations européennes, par exemple, une association entre la MC et la mutation du gène *atg16l2* qui affecte la fonction de l'autophagie chez la MC malgré l'absence d'association des mutation de gène *nod2* et/ ou *atg16l1* (Yang et al., 2014). En conclusion, la variation importante au sein des facteurs génétiques de susceptibilité des MICI suggère qu'il existe une hétérogénéité génétique au sein d'une même population ainsi qu'entre les différentes populations.

## **Polymorphismes dans les gènes d'immunité**

L'IL-10 joue un rôle essentiel dans la régulation des réponses anti-inflammatoires et le maintien de l'homéostasie de la muqueuse du tractus gastro-intestinal. La liaison de l'IL-10 à son récepteur tétramérique, entraîne l'activation de la tyrosine kinase 2 (Tyk2) et de la Janus kinase 1 (JAK1), conduisant à la phosphorylation du signal transducteur, à l'activation du facteur de transcription 3 (STAT-3) et au déclenchement de la transcription des gènes cibles. Ceci favorise l'expression des effecteurs anti-inflammatoires (Hutchins et al., 2013). Des études conséquentes ont indiqué que les enfants présentant des mutations dans les gènes codant pour le récepteur à IL-10, ou la cytokine IL-10 elle-même, semblaient avoir des colites sévères pouvant conduire au développement de MICI au jeune âge (Beser et al., 2015). Les gènes du récepteur de l'IL-10 (*il-10ra* et *il-10rb*) ont été parmi les premiers gènes associés à l'apparition précoce de MICIs (Glocker et al., 2009; Kotlarz et al., 2012).

La première étude (GWAS) concernant les MICIs a porté sur une cohorte de la population japonaise relativement limitée (94 cas), qui a permis d'identifier *tnfrf15* comme un gène de susceptibilité (Yamazaki et al., 2005). L'association « dominante » de *tnfrf15* avec la MC en



Asie de l'Est a été confirmée (Kakuta et al., 2006; Yang et al., 2008), et des associations, plus modestes, ont été reportées dans les populations d'ascendance européenne suggérant que l'architecture génétique des MICIs serait similaire chez les Asiatiques et les Européens (Picornell et al., 2007; Tremelling et al., 2008).

### **2.5.3. Impact de la perméabilité intestinale sur le développement des MICIs**

La fonction de la barrière épithéliale intestinale est indispensable pour prévenir de nombreux troubles intestinaux et extra-intestinaux. L'association entre la diminution de la fonction barrière et la présence des maladies inflammatoires chroniques intestinales a été signalée pour la première fois au début des années 1980 (Pearson et al., 1982; Ukabam et al., 1983). Ces études, qui ont utilisé des approches *ex-vivo* et *in vivo*, ont démontré une augmentation de la perméabilité dans la MC et la RCH et chez certains parents sains de premier degré de patients atteints de la maladie de Crohn. Cette perméabilité n'est pas en relation directe avec les ulcérations (Hollander et al., 1986; Teshima et al., 2017; Welcker et al., 2004). Ces résultats montrent que la perméabilité intestinale pourrait être un facteur primordial de la pathogenèse des MICIs qui précéderait le développement de l'inflammation (Yacyshyn and Meddings, 1995).

#### **Perméabilité et jonctions serrées**

L'expression et la distribution des protéines de jonctions serrées sont modifiées dans les MICIs (Lee, 2015; Prasad et al., 2005; Salim and Söderholm, 2011; Weber et al., 2008). L'analyse des claudines dans des échantillons humains a révélé que l'expression de la Claudine 2 est augmentée dans les MICIs (Zeissig et al., 2007). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'augmentation de l'expression du gène *claudine 2* est responsable de l'augmentation du flux des pores induit par l'IL-13 (Weber et al., 2010). Ainsi, l'augmentation de la Claudine 2 et de ce fait du flux serait un mécanisme potentiel expliquant l'augmentation de la perméabilité paracellulaire, observées dans les MICIs. L'IL-13 pourrait ne pas être le seul médiateur de l'induction de Claudine 2 dans les MICI (Mankertz et al., 2009; Suzuki et al., 2011). Il est cependant intéressant de noter que l'expression de claudine 2 est plus grande chez les patients souffrant de RCH que ceux atteints de MC, ainsi que la production de l'IL-13 par les cellules mononuclées de la *lamina propria*, ce qui déclencherait une augmentation du taux d'apoptose épithéliale qui conduirait à des micro-érosions (Heller et al., 2005). A l'inverse, des études ont montré que l'expression des protéines telles que ZO-1, Occludine, Claudine 3, Claudine 4 et Claudine 5,

importante pour la fonction barrière de l'épithélium, est diminuée chez les patients souffrant de MC et/ou RCH (Ahmad et al., 2017).

### **Perméabilité et facteurs génétiques**

Les facteurs génétiques semblent jouer un rôle dans la perméabilité et donc sur le développement des MICIs. Par exemple, une perméabilité élevée des muqueuses intestinales est corrélée à une mutation CARD15 3020insC chez les MC (Buhner et al., 2006). De plus, l'augmentation de la perméabilité a été associée à un risque plus élevé de rechute chez les patients atteints de MC (Arnott et al., 2000; Wyatt et al., 1993).

### **Perméabilité et immunité/apoptose**

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) des cellules épithéliales entraîne également une augmentation de la perméabilité intestinale. Plusieurs études ont montré que dans l'inflammation intestinale, le mécanisme de l'apoptose augmente. Sipos *et al.* ont trouvé que le taux d'apoptose dans les cellules épithéliales était augmenté chez les RCH (Sipos et al., 2005). Le TNF- $\alpha$ , l'un des principaux effecteurs de l'inflammation des MICI et d'autres cytokines pro-inflammatoires, affectent la perméabilité intestinale via plusieurs mécanismes. Par exemple, une augmentation de l'activité enzymatique de la kinase de la chaîne légère de la myosine est associée aux MICI en phase active (Blair et al., 2006), affectant ainsi les jonctions serrées et donc favorisant la perméabilité. La neutralisation du TNF réduit la sévérité de la maladie et restaure également la fonction de la barrière intestinale chez les patients atteints de MICI (Suenart et al., 2002).

## **2.5.4. Facteurs Microbiologiques**

### **2.5.4.1. Le microbiote intestinal**

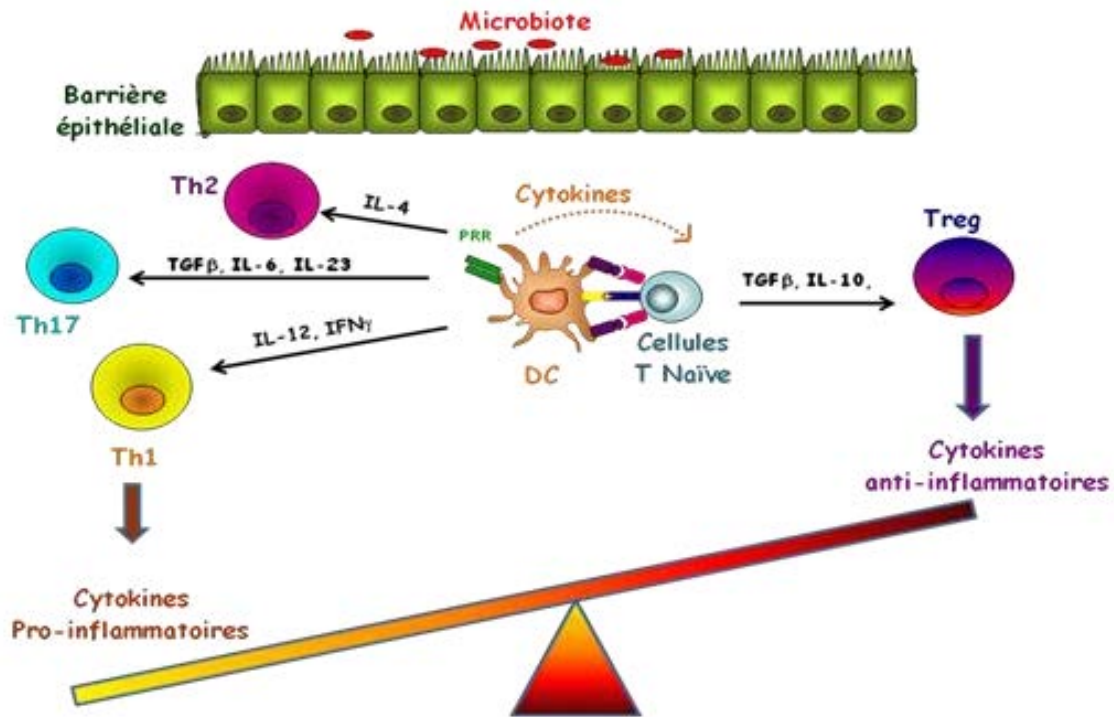
Le microbiote intestinal humain englobe une variété de micro-organismes, incluant des bactéries, des archées, des virus, des levures et des protozoaires. L'ensemble de ces microbes et de leurs gènes est appelé "microbiome intestinal" (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Ce microbiote s'implante dès la naissance et la colonisation microbienne de l'intestin du nouveau-né est fonction du mode d'accouchement (accouchement naturel par voie basse versus césarienne) et du type d'alimentation (lait maternel versus lait maternisé) (Dominguez-Bello et al., 2010). Cette colonisation est également fortement influencée par des signaux extrinsèques, tels que l'environnement dans les premiers jours et semaines de vie et de la prise de médicament, notamment d'antibiotiques. Ces facteurs comportementaux peuvent déterminer la future composition du microbiote intestinal et avoir un impact sur sa diversité (Cotillard et al., 2013; Koenig et al., 2011). Après cette période critique, le microbiote devient relativement stable vers l'âge de 2 à 4 ans, mais des

facteurs d'interférence (antibiotiques, médicaments, infections, hygiène excessive, nutrition, mode de vie) peuvent moduler sa composition, pouvant entraîner dans certains cas de graves conséquences à long terme (Cox et al., 2014; Leone et al., 2014). Par exemple, des modifications d'habitudes alimentaires sur une longue durée ont une influence significative sur le développement de microorganismes spécifiques. Trois groupes différents de microbiotes ont été proposés, appelés entérotypes, déterminés par la prédominance de 3 types de bactéries (Arumugam et al., 2011). Plusieurs études ont montré qu'une alimentation riche en graisses et en protéines animales est associée au genre *Bacteroides*, tandis qu'un régime riche en glucides favorise la colonisation en genre *Prevotella* (Arumugam et al., 2011; Wu et al., 2011). Environ 38 mille milliards de micro-organismes composent le microbiote intestinal représenté par quelque 200 espèces différentes au sein d'un même individu (Sender et al., 2016), regroupées en deux principaux phyla: les Firmicutes qui représentent en moyenne 64% et les Bactéroidetes 23% du microbiote intestinal, associés à d'autres phyla ayant une abondance plus faible, dont les Protéobactéries et les Actinobactéries (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Lozupone et al., 2013, 2012). Le génome du microbiote est 100 à 150 fois plus important que celui du génôme humain, apportant ainsi de nombreuses propriétés fonctionnelles. La majorité de ces microbes intestinaux colonise le colon qui correspond au site majeur des réactions métaboliques, atteignant  $10^{11}$  à  $10^{12}$  CFU/ gramme de contenu et sont majoritairement anaérobies strictes et difficilement cultivables. Le développement des nouveaux outils moléculaires de séquençage puis de métagénomique, nous ont permis d'avoir une idée plus précise de la richesse et la diversité du microbiote et commencer à appréhender ses fonctions. Chaque individu héberge un microbiote intestinal dont la composition lui est spécifique. De plus, la proportion entre les différents phyla varie considérablement entre chacun. Plus de 1000 espèces différentes de bactéries ont été détectées dans les échantillons fécaux humains et dans les biopsies. En condition physiologique chez l'individu sain, le microbiote intestinal est relativement stable et résilient. Il peut être temporairement modifié mais tend toujours à revenir à son état d'équilibre. Ces facteurs dits «extrinsèques», pourraient modifier temporairement le microbiote intestinal (Faust et al., 2015). En outre, une variété de facteurs de l'hôte, y compris le sexe, l'âge, le stress psychologique et l'état de santé ont été signalés comme d'autres facteurs affectant le microbiote intestinal (Claesson et al., 2012; Dominguez-Bello et al., 2010).

Le microbiote intestinal est impliqué dans différents processus physiologiques, tels que le développement et la maturation de l'épithélium intestinal et la régulation du système immunitaire, la digestion et le métabolisme, le contrôle de certaines fonctions endocrines. De nombreuses études démontrent de plus en plus que les microorganismes intestinaux sont impliqués dans le développement cérébral et la signalisation du système nerveux

central (Doré et al., 2013). Les enzymes digestives retrouvées dans le tube digestif humain sont incapables de dégrader certains glucides tels que la cellulose et les fibres. Ce sont les bactéries du microbiote qui convertissent ces composés par fermentation, générant des métabolites bénéfiques pour l'hôte, notamment des acides gras à chaîne courte (AGCC, ou Short Chain Fatty Acids, en Anglais) possédant des propriétés anti-inflammatoires. Le butyrate, l'acétate et le propionate sont les AGCC les plus connus et constituent la source principale d'énergie pour les cellules épithéliales du côlon. Ils jouent également un rôle crucial dans la régulation métabolique, notamment l'homéostasie glucidique. De plus, quelques membres du microbiote intestinal sont capables de dégrader les protéines pouvant entraîner la production de divers métabolites toxiques. Certains microorganismes peuvent également synthétiser diverses molécules organiques essentielles pour l'hôte, telles que certains acides aminés (Rajilić-Stojanović, 2013), certaines vitamines comme la vitamine K et le complexe de vitamines B (Ramakrishna, 2013). Certains sont également capables de détoxifier des composants (xénobiotiques) notamment des molécules cancérigènes.

Le développement et la maturation du système immunitaire humain sont influencés à la fois par la génétique de l'hôte et par des éléments environnementaux. Le microbiote joue un rôle primordial dans la maturation de l'épithélium intestinal, et renforce sa fonction barrière en stimulant les jonctions serrées et la production de mucus. La maturation du tissu lymphoïde associé à l'intestin dépend de l'interaction postnatale avec le microbiote, permettant l'expansion du tissu lymphoïde et la formation des centres germinaux contenant des cellules B sécrétrices d'IgA (Sommer and Bäckhed, 2013). Les souris axéniques, c'est-à-dire sans germes, présentent un faible nombre de plaques de Peyer, ainsi que des niveaux plus bas d'IgA, comparativement aux souris conventionnelles. Ces résultats suggèrent que le microbiote intestinal est impliqué dans la production d'IgA au niveau des muqueuses (Wu and Wu, 2012). Le microbiote joue un rôle considérable aussi dans la régulation du système immunitaire en modulant l'activation des DCs et la polarisation des lymphocytes T (Figure 9). Certaines bactéries, telle que la bactérie filamenteuse segmentée (SFB), stimulent plus particulièrement les réponses Th17 importantes dans les mécanismes de défense et de renforcement de la barrière, alors que d'autres microorganismes favorisent les réponses T régulatrices contribuant ainsi à restaurer la balance immunitaire. Notamment certains lactobacilles ou bifides induisent préférentiellement une polarisation vers des réponses de type T régulatrices (Macho Fernandez et al., 2011).



**Figure 9: Déséquilibre de la production des cytokines anti-inflammatoires et pro-inflammatoires chez les patients atteints de MICI**

Le microbiote intestinal joue également un rôle essentiel dans la prévention contre la colonisation d'agents infectieux. Le mécanisme implique de multiples processus tels que la compétition avec les pathogènes sur les éléments nutritifs, la saturation des récepteurs et l'occupation de niches, la production de substances anti-microbiennes par les bactéries telles que les bactériocines et la stimulation des cellules de Paneth de l'hôte à produire des peptides anti-microbiens.

Le microbiote joue donc un rôle dans les fonctions principales de notre organisme, fonctions digestives, métaboliques, immunitaires et neurologiques. En conséquence, toute altération durable de sa composition appelée dysbiose, entraînant une altération qualitative et fonctionnelle du microbiote, peut avoir des conséquences dramatiques et entraîner le développement de pathologies chroniques, inflammatoires, auto-immunes ou métaboliques ainsi que des pathologies comportementales (Lepage et al., 2011; Willing et al., 2010). Des dysbioses ont été associées à diverses pathologies humaines, telles que les MICIs, et le syndrome du côlon irritable (Collins, 2014), la diarrhée chronique (Swidsinski et al., 2008), l'obésité (Le Chatelier et al., 2013), le diabète (Qin et al., 2012), l'autisme (Adams et al.,

2011), le cancer colorectal (Schwabe and Jobin, 2013), les maladies cardiovasculaires (Serino et al., 2014), et les pathologies hépatiques (Miura and Ohnishi, 2014).

#### 2.5.4.2. Microbiote et MICIs

Plusieurs éléments essentiels mettent l'accent sur le rôle du microbiote dans la pathogenèse des MICI. Les modèles animaux d'iléite et de colites chroniques nécessitent la présence d'un microbiote intestinal pour déclencher la pathologie. Les souris sans germes sont en effet plus résistantes à la colite induite par du DSS que les souris conventionnelles (Hudcovic et al., 2001). Ces résultats suggèrent la participation du microbiote intestinal dans le déclenchement de l'inflammation intestinale. De plus, l'inflammation est maximale au niveau des sites où la concentration bactérienne est la plus élevée et l'administration d'antibiotiques entraîne habituellement une réduction de l'inflammation chez les patients atteints de MICI (Khan et al., 2011; Prantera et al., 2012; Schaubeck et al., 2016).

De nombreuses études ont comparé la composition du microbiote intestinal de patients atteints de MICI avec celle d'individus sains et ont montré que les patients atteints de MICI présentent des dysbioses du microbiote (Manichanh et al., 2006; Sokol et al., 2009). Des études expérimentales *in vivo*, montrent que l'induction d'une inflammation aiguë, par exemple, par des substances chimiques telles que le DSS peut entraîner des modifications du microbiote intestinal (Rautava et al., 2015; Schwab et al., 2014). Ces études avaient pour but de déterminer une potentielle signature microbienne associée à la maladie (Ott et al., 2004; Scanlan et al., 2006; Willing et al., 2010), afin de pouvoir cibler ces modifications dans la prise en charge thérapeutique des patients. Elles ont mis en évidence une diminution de la diversité des espèces, notamment au sein des Firmicutes, dont une diminution d'*Erysipelotrichales*, de Ruminococcaceae, et du groupe de *Clostridium leptum*, en particulier de *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol et al., 2009) qui représente une espèce bactérienne dominante du microbiote, dont l'abondance est fortement diminuée dans la MC. La perte de bactéries potentiellement bénéfiques, notamment productrices de butyrate (*Faecalibacterium*, Christensenellaceae, *Methanobrevibacter* et *Oscillospira*) est plus associée à la MC que la RCH (Pascal et al., 2017). *F. prausnitzii* a été démontrée comme ayant des capacités anti-inflammatoires chez la souris (Sokol et al., 2008), capacité retrouvée par une protéine de 15kDa capable d'inhiber la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales intestinales et prévenir une colite en modèle expérimental. De plus, des faibles taux de *F. prausnitzii* dans la muqueuse ont été associés à un risque élevé de réactivation précoce de la MC iléale, tandis que le rétablissement des taux de *F. prausnitzii* est associé au maintien de la rémission clinique de la RCH (Sokol et al., 2008). Alors que *F. prausnitzii* est

faiblement retrouvée dans les biopsies de patients souffrant de MC et RCH, on observe à l'inverse une augmentation de l'abondance des gamma protéobactéries et des Enterobacteriaceae au niveau de l'épithélium et dans la *lamina propria* (Lepage et al., 2011; Lopez-Siles et al., 2016; Quévrain et al., 2016). Des études ont notamment montré une plus forte abondance d'*E. coli* adhérents invasifs (AIEC) (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Prosberg et al., 2016; Sokol et al., 2009; Walters et al., 2014). L'adhésion des OAIEC aux cellules épithéliales intestinales induit la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 et de la chimiokine CCL20 (C-C motif-Ligand 20), entraînant une forte production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les macrophages (Eaves-Pyles et al., 2008). Cette observation a mis l'accent sur le fait qu'une infection transitoire par des agents pathogènes pourrait agir comme un déclencheur environnemental pour initier des réponses inflammatoires dans le colon et augmenter la perméabilité intestinale. A l'inverse, certains genres bactériens comme *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, connus pour exercer des effets bénéfiques contre l'inflammation des muqueuses sont diminués dans les MICIs (Favier et al., 1997; Seksik et al., 2003).

Les patients atteints de MICI présentent également des altérations de la fonction et de la capacité métabolique du microbiote intestinal. La production d'AGCC ou la capacité des tissus hôtes à utiliser ces métabolites pourraient être altérées dans des conditions d'inflammation chronique (Huda-Faujan et al., 2010). Il a été démontré que les concentrations de butyrate dans les fèces sont diminuées chez les patients atteints de MICI. Le butyrate est un nutriment majeur pour les entérocytes et favorise la production de mucine et de PAM. L'absence de cette source d'énergie entraînerait (i) une privation d'énergie, (ii) une altération de la fonction barrière par la diminution de la production des mucines et ainsi, (iii) une augmentation de la translocation bactérienne (Morgan et al., 2012). Plusieurs espèces bactériennes productrices de butyrate, telles que *Roseburia hominis* et *F. prausnitzii*, ont été retrouvées en faible concentration chez les patients atteints de MICI par rapport à leurs frères et sœurs qui étaient en bonne santé (Lepage et al., 2011; Machiels et al., 2014; Willing et al., 2009). D'autres études ont mis en évidence que la bactérie productrice de butyrate *Butyricoccus pullicaecorum* est moins représentée dans les échantillons fécaux de patients atteints de MICI et que cette bactérie est capable de limiter la colite induite par du TNBS chez le rat (Eeckhaut et al., 2013). Des études récentes ont montré que les AGCC aident à la maturation et la fonction des cellules T régulatrices coliques impliquées, ce qui pourrait expliquer leur effet protecteur en modèle murin de colite (Smith et al., 2013). Ces espèces bactériennes pourraient de ce fait être considérées comme des marqueurs diagnostiques pour les MICI. Un autre exemple d'altération fonctionnelle du microbiote intestinal dans les MICI est représenté par l'augmentation des bactéries sulfato-réductrices chez les patients ayant une RCH (Pitcher et

al., 2000). Ces bactéries produisent du sulfure d'hydrogène, toxique pour les cellules épithéliales intestinales et pouvant ainsi provoquer une inflammation locale des muqueuses.

L'augmentation de l'incidence des MICIs dans les pays développés est supposée d'être partiellement liée aux habitudes alimentaires et à la surutilisation d'antibiotiques qui perturberaient la composition du microbiote (David et al., 2014; Dethlefsen and Relman, 2011; Willing et al., 2011). Comme déjà évoqué, le tabagisme est un exemple de facteur qui modifie la composition du microbiote et est impliqué dans l'exacerbation de l'inflammation dans la MC et l'augmentation du risque de récurrence chirurgicale et clinique (Reese et al., 2008), alors qu'il a une influence bénéfique sur l'évolution de la RCH. Certains traitements médicamenteux administrés à des patients atteints de MC, tel qu'un traitement par des anticorps anti-TNF- $\alpha$ , peuvent modifier la composition du microbiote, permettant une restauration de *F. prausnitzii* (Busquets et al., 2015; Lopez-Siles et al., 2015). Ceci suggère que le statut inflammatoire peut avoir un impact sur la composition du microbiote.

Il est souvent admis que le microbiote reste séquestré au sein de la lumière intestinale, séparé de l'épithélium par le mucus et également à distance du fond des cryptes où se trouvent les cellules souche et les cellules de Paneth (Earle et al., 2015). De plus, chez les sujets sains, la sécrétion normale de PAMs par les cellules de Paneth permet de préserver l'équilibre du microbiote et éviter la prolifération de bactéries néfastes (Shanahan, 2013; Swidsinski et al., 2009). Cependant, chez les patients atteints de MC et RCH, l'abondance des bactéries associées à la muqueuse augmente de façon significative. Cette concentration semble être plus élevée (presque le double) chez les patients atteints de RCH (Bibiloni et al., 2006). Ceci pourrait être attribué à une diminution de sulfatation des mucines dans la RCH. Les mucines du côlon sont en effet fortement sulfatées à l'état physiologique, favorisant une résistance à sa dégradation par les enzymes bactériennes (Corfield et al., 1996). Ainsi, une translocation de bactéries de la lumière intestinale vers l'épithélium, peut s'observer dans le cas des MICI, suite à l'altération de la barrière intestinale (Sokol and Seksik, 2010). Des composants du microbiote peuvent également établir un dialogue étroit avec l'épithélium et la crypte intestinale (Earle et al., 2015).

### **2.5.4.3. Rôle des polymorphismes génétiques associés aux MICIs sur la composition du microbiote**

Le rôle central du microbiote intestinal dans le développement des MICI a été confirmé par GWAS et dans des études *in vivo*. Une variété de mutations génétiques est impliquée dans



la perturbation des interactions hôte-microbiote. Ces gènes peuvent avoir un rôle différent dans la reconnaissance et la clairance microbienne (Jostins et al., 2012; J. Z. Liu et al., 2015). Ils sont divisés en 4 groupes de gènes responsables de (i) la perte de fonction barrière (cadherin-1 *cdh1*, Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  *HNF4A*, Laminin subunit  $\beta$ -1 (LAMB1), *muc19*) (Prager et al., 2015), (ii) l'incapacité à maintenir l'homéostasie des cellules épithéliales intestinales (*xbp1*, *ormdl3*) ciblant spécifiquement les cellules de Paneth, (iii) la perte des réponses immunes innées permettant la clairance microbienne tel que des gènes codant NOD2 et des gènes impliqués dans les processus d'autophagie (*atg16l1* et *irgm*), (iv) la perte de tolérance (*tnfs15*, *il10rb* et *il-23r*) (Jostins et al., 2012; J. Z. Liu et al., 2015). Les souris déficientes pour *Nod2*, par exemple, présentent une diminution significative des différents phyla de Bacteroidetes et de Firmicutes dans leur iléon terminal, et une capacité réduite à éliminer les bactéries pathogènes (Petnicki-Ocwieja et al., 2009). Les patients de MC et/ou RCH possédant des mutations dans le gène codant NOD2 (Leu1007fs, R702W ou G908R), présentent souvent une diminution des groupes *Clostridium* XIVa et IV et une augmentation des actinobactéries et des protéobactéries (Frank et al., 2011).

Knights *et al.* ont analysé des échantillons de biopsies intestinales provenant de patients atteints de MICI et ont rapporté une association entre le nombre d'allèles à risque NOD2 et l'augmentation de l'abondance relative des Enterobacteriaceae. Ils ont également suggéré que d'autres loci [par exemple codant pour TNF Superfamily Member 15 (TNFSF15) et la sous unité p40 de IL-12 (IL12B)] semblaient affecter la structure taxonomique du microbiome (Knights et al., 2014). Une étude chez des individus en bonne santé a montré que la mutation IRGM (SNP rs11747270) est associée à une présence accrue de *Prevotella* (Quince et al., 2013). Dans le même ordre d'idées, les patients atteints de MICI ont des réponses immunitaires exacerbées dirigées contre le microbiote intestinal en raison de mécanismes immunorégulateurs déficients et / ou de défaut de la barrière muqueuse. Le nombre de microorganismes associés aux muqueuses augmente et la distance entre le microbiote intestinal et l'épithélium intestinal est réduite par une couche muqueuse plus fine ou plus perméable (Baumgart and Sandborn, 2012; Johansson et al., 2014).

## Chapitre 3 : Le rôle de l'autophagie dans les MICIs

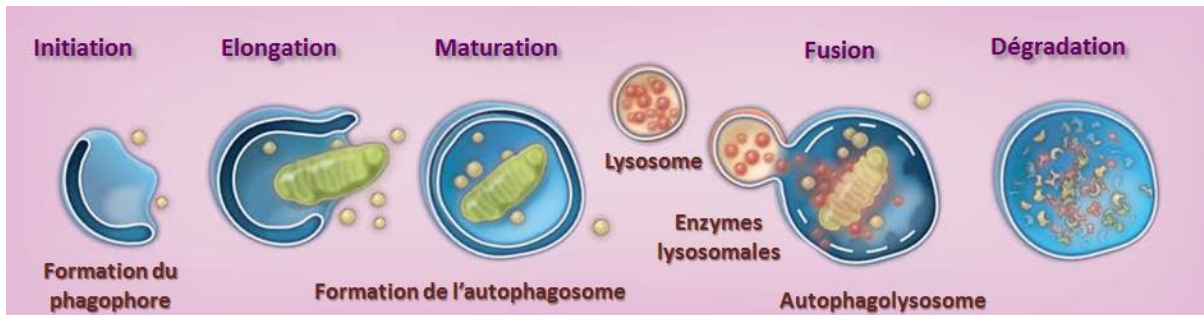
### 3.1. Le processus d'autophagie

L'autophagie est un processus physiologique de régulation cellulaire clé pour la dégradation et le recyclage des protéines et des organites non fonctionnels dans la cellule. Il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires et assurant une fine régulation entre la biosynthèse et le catabolisme de macromolécules, permettant le maintien de l'homéostasie. C'est un

processus qui permet une auto digestion des composants cellulaires en réponse à un stress environnemental tel que la déprivation en acides-aminés, le stress du réticulum endoplasmique ou lors de certaines infections virales et bactériennes. L'autophagie joue un rôle essentiel dans le fonctionnement et l'activation du système immunitaire inné et adaptatif. Il joue également un rôle important dans les mécanismes de défense impliqués dans la sécrétion de cytokines, de PAMs et de mucines. Ce processus est important dans l'élimination des pathogènes intracellulaires (xénophagie) en générant ainsi des peptides secondaires présentés par le CMH. Finalement, il joue un rôle majeur dans la survie cellulaire et l'apoptose (Canonico et al., 2016; Deretic, 2016).

Il y a trois voies différentes d'autophagie. Deux voies sont retrouvées chez les organismes eucaryotes : voie macro-autophagie et micro-autophagie. La troisième voie est présente chez les organismes eucaryotes évolués: l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (*Chaperone Mediated Autophagy*) (Kaser and Blumberg, 2011; Li et al., 2011). Ce type d'autophagie est un mécanisme sélectif d'autophagie qui permet la dégradation, par le lysosome, des organites et des protéines présentant un motif peptidique reconnu par ces protéines chaperonnes (pentapeptide KFERQ) (Xilouri and Stefanis, 2016). La micro-autophagie est un processus de dégradation non sélectif par invagination des membranes lysosomales / vacuolaires permettant l'immersion des composantes cytoplasmiques (Huber and Teis, 2016). La macro-autophagie (autophagie commune) est un processus responsable du catabolisme cellulaire, qui se caractérise par la formation d'une double membrane ou phagophore qui va s'allonger et englober les composants intracellulaires ou les bactéries invasives pour conduire à des autophagosomes. Ces autophagosomes vont alors fusionner avec des lysosomes pour former des d'autophagolysosomes, ce qui va conduire à la dégradation du contenu par les enzymes lysosomales et faciliter la libération des molécules recyclées par la membrane vers le cytoplasme (Feng et al., 2014; He and Klionsky, 2009; Hurley and Schulman, 2014; Mizushima, 2007). L'élimination de microorganismes par cette voie joue un rôle important dans la défense anti-microbienne et l'immunité cellulaire.

L'autophagie est un processus qui se déroule en plusieurs étapes : 1) l'induction consistant en formation d'une structure multi-membranaire, appelée phagophore, 2) l'élongation qui permet l'allongement de cette membrane afin de séquestrer le contenu cytoplasmique à éliminer, jusqu'à la fermeture de la vésicule, alors dénommée autophagosome, 3) la maturation et, 4) la fusion avec un lysosome pour former l'autophagolysosome. Le matériel ainsi séquestré va être alors dégradé par les enzymes lysosomales (Figure 10).



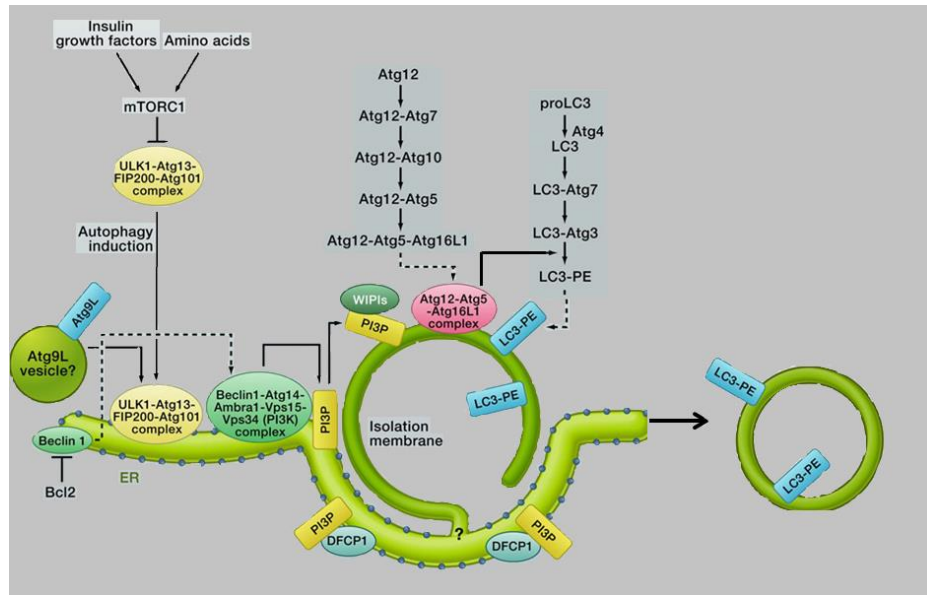
**Figure 10: Les différentes phases de l'autophagie (adapté de Choi *et al.*, 2013)**

La protéine kinase mTor est l'acteur central du contrôle de l'induction de l'autophagie. La formation de l'autophagosome est alors orchestrée par un ensemble de protéines nommées ATG pour « AuTophagy related » proteins (Tableau 1) qui sont impliquées dans les différentes étapes du processus (Mizushima *et al.*, 2011) (Figure 11).

La protéine mTOR est couplée au complexe Atg1/Ulk1 (mTORC1). Dans certaines conditions, telle que la diminution en nutriments (starvation) ou de divers signaux tels que la présence des pathogènes intracellulaires ou le traitement des cellules avec des éléments qui active l'autophagie tel que la rapamycine, mTORC1 se dissocie du complexe ULK1 (lui-même composé de *ULK1-ATG13-FIP200-ATG101*) (Hosokawa *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009). ULK1 va se relocaliser au niveau du réticulum endoplasmique pour activer le complexe PI3K de classe III (composé de BECLIN 1-ATG14 (BARKOR)-AMBRA1-Vps15 (p150)-Vps34). Ceci va induire la formation de la membrane de l'autophagosome. Cette étape entraîne l'activation du second complexe fonctionnel, le complexe phosphatidylinositol 3-kinase de type 3 (PI3K), dont les composants principaux sont les protéines vacuolaires 34 et 15 (Vps34 et Vps15), Beclin1 et Atg14 (Hara and Mizushima, 2009; Jung *et al.*, 2009; Mercer *et al.*, 2009; Reggiori *et al.*, 2005). Le complexe PI3K intervient dans l'étape de nucléation de la formation des phagophores. Lorsque qu'il est activé, il produit le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) conduisant au recrutement de protéines effectrices de PI3P tel que les protéines WIPI 1 et 2 à la membrane phagophore (Polson *et al.*, 2010; Proikas-Cezanne *et al.*, 2004; Xie and Klionsky, 2007). ATG9L participe également à l'initiation de la formation de l'autophagosome. L'allongement et la fermeture de la membrane autophagosomale nécessite l'action ultérieure des complexes ATG5-Atg12/ATG16L1, assemblé grâce à l'action d'Atg7 (Enzyme E1-like) et d'Atg10 (Enzyme E2-like) (Mizushima *et al.*, 2003, 1998; Shaid *et al.*, 2013; Yang and Klionsky, 2009). Ainsi Atg13 est partiellement déphosphorylée (mTor contrôlant son état de phosphorylation) ce qui permet sa liaison avec Atg1. Ce complexe se lie ensuite à Atg11 et Atg17 induisant ainsi une augmentation de l'autophagie.

**Tableau 1: Les principales protéines impliquées dans le processus d'autophagie (d'après Choi *et al*, 2013)**

Protéines autophagiques	Gène	Fonction dans la régulation de l'autophagie
ULK1	<i>ULK1</i>	Protéine majeure impliquée dans l'initiation de l'autophagie et interagit avec mTORC.
ATG3	<i>ATG3</i>	Enzyme de types E2 Ubiquitine agit comme ligase pour ATG8 et ATG12, catalyse la conjugaison des protéines de type ATG8 à la PE.
ATG4B	<i>ATG4B</i>	Enzyme clivant ATG8 laissant apparaître un résidu cystéine, convertit la pro-LC3(ATG8) en LC3-I, clive la protéine LC3-II
ATG5	<i>ATG5</i>	Forme un complexe avec ATG12 participe à l'élongation de l'autophagosome
Beclin 1	<i>BECN1</i>	Protéine qui interagit avec Bcl-2, forme un complexe régulateur avec la PI3K de classe III
ATG7	<i>ATG7</i>	Enzyme conjugase de type E1 Ubiquitine pour la conjugaison d'ATG12 a ATG5 et ATG3, facilite la conjugaison des protéines ATG8 à PE
ATG9A	<i>ATG9A</i>	Associée avec les structures pré-autophagosomale chez les levures, participe à la formation de l'autophagosome
ATG10	<i>ATG10</i>	Enzyme ligase de type E2 Ubiquitine, catalyse la conjugaison d'ATG5 et ATG12
ATG12	<i>ATG12</i>	Forme un complexe avec ATG5, participe à l'élongation de la membrane autophagosomale
ATG14L	<i>ATG14</i>	Régulateur positif de complexe PI3K de classe III
ATG16L	<i>ATG16</i>	Associée avec la membrane d'isolation dans la complexe ATG5-ATG12, participe à l'élongation de la membrane autophagosomale
LC3	<i>MAP1LC3B</i>	Modifiée par un system de conjugaison PE, stablement associé avec la membrane autophagosomale



**Figure 11: les protéines clés impliquées dans la voie de l'autophagie (d'après Mizushima et al., 2011)**

La cystéine protéase Atg4, clive ensuite le résidu arginine de protéine LC3 à l'extrémité C-terminale pour exposer un résidu glycine accessible à ATG7, ce qui permet la conjugaison de phosphatidyléthanolamine (PE) à la forme soluble de protéine LC3 (LC3-I), et l'incorporation ultérieure de LC3-PE (LC3-II) dans les membranes internes et externes de l'autophagosome (Kabeya et al., 2004, 2000; Weidberg et al., 2010). La protéine LC3-II, ainsi liée à la membrane, reste associée aux autophagosomes et semble jouer non seulement un rôle dans le développement et la fermeture de la membrane d'autophagosome mais est également importante pour la fixation des adaptateurs autophagie et donc dans la modulation des différents types d'autophagie. LC3-II est la seule protéine Atg connue à ce jour comme présente au stade d'autophagosome, toutes les autres étant recyclées (grâce à l'action du complexe Atg9). Elle représente ainsi le marqueur le plus spécifique pour l'identification de l'autophagosome et donc de l'activation du processus (Geng and Klionsky, 2008).

La fusion avec le lysosome nécessite l'action du complexe HOPS (homotypic fusion and protein sorting) et les protéines SNARE (soluble NSF attachment protein receptors) (Itakura et al., 2012; Jiang et al., 2014; Takáts et al., 2014, 2013). Lors de la formation du compartiment de l'autolysosome, les enzymes lysosomales dégradent la membrane interne et le contenu intra-vacuolaire, ce qui permet la dégradation et le recyclage des pathogènes intracellulaires et la présentation des peptides par le CMH pour activer l'immunité adaptative (Figure 11).

L'utilisation d'inhibiteurs d'autophagie est une stratégie efficace pour explorer les mécanismes impliquant l'autophagie et son rôle dans les pathologies. Les inhibiteurs chimiques de l'autophagie les plus largement utilisés sont divisés en deux catégories en fonction des étapes de blocage (Klionsky et al., 2016). La première catégorie regroupe des inhibiteurs qui bloquent la formation des autophagosomes, en inhibant notamment la PI3K, regroupant la 3-méthyladénine (3-MA), le LY294002 et la wortmannine. La seconde catégorie regroupe des inhibiteurs post-séquestration, conduisant à l'accumulation du matériel séquestré dans l'autophagosome ou l'autolysosome, incluant la vinblastine, la leupeptine et la bafilomycine A1 (Klionsky et al., 2016). A l'inverse, la rapamycine qui est un inhibiteur de mTor, est un activateur de l'autophagie.

### **3.2. Polymorphismes génétiques liés à l'autophagie**

Les analyses GWAS de patients atteints de MICI ont rapporté plusieurs polymorphismes dans des gènes associés au processus d'autophagie, tels que *atg16l1* et *irgm*. La présence de mutations dans ces gènes, entraîne des défauts de réponse autophagique suggérant que l'autophagie joue un rôle essentiel dans le développement et la physiopathologie des MICI (Hampe et al., 2007; Parkes et al., 2007; Rioux et al., 2007). Les défauts en ATG16L1 empêche le recrutement du conjugué ATG12-ATG5 à la membrane, et de ce fait la séquestration du contenu cellulaire à dégrader. IRGM est nécessaire pour la phase d'initiation et est fortement impliqué dans la clairance des organismes intracellulaires. Des perturbations de l'autophagie jouent un rôle multiple dans la pathogénèse des MICIs, en altérant les processus de défense anti-microbienne, notamment la sécrétion des peptides anti-microbiens par les cellules de Paneth, la régulation des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, la fonction de présentation antigéniques des DCs, et la réponse au stress du réticulum endoplasmique dans les entérocytes.

De plus les polymorphismes dans le gène codant NOD2, capable d'interagir physiquement avec ATG16L1, semblent également être impliqués dans les défauts d'autophagie observés dans les MICIs, suggérant un mécanisme de convergence clé dans la MC (Fritz et al., 2011).

Différents variant génétiques de facteurs impliqués dans les MICI et l'autophagie ont été décrits et sont reportés dans le Tableau 2.

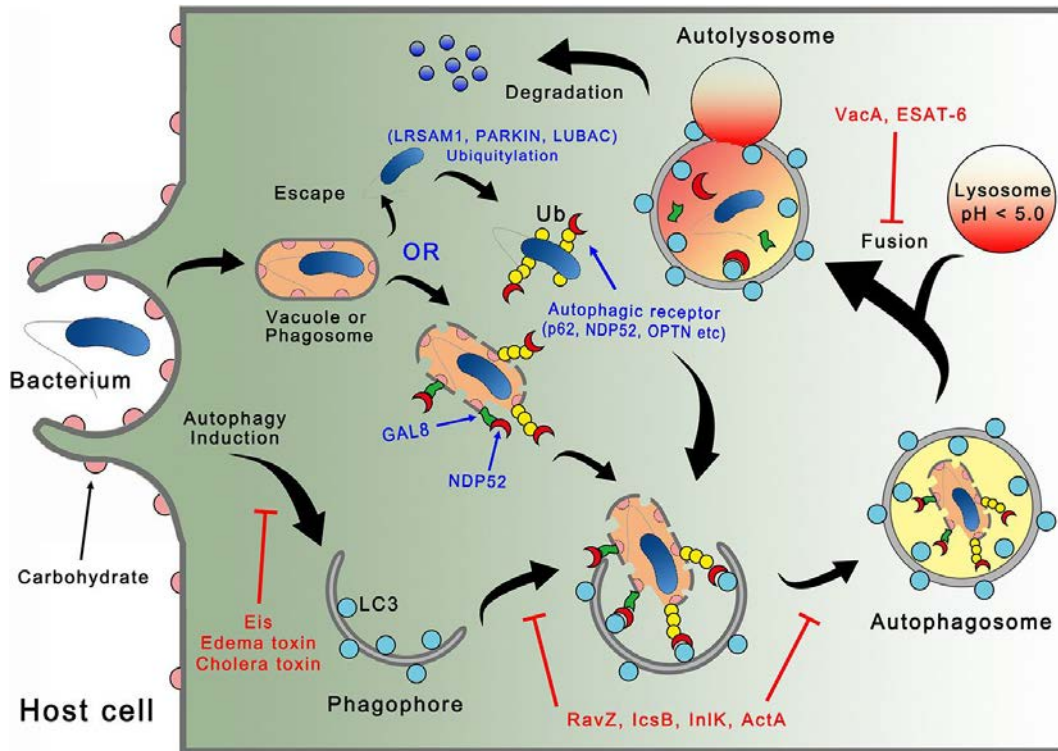
**Tableau 2: Variants génétiques reliés à l'autophagie et aux MICI (d'après Iida et al., 2017).**

Gènes	Relation avec l'autophagie
ATG16L1	Formation de l'autophagosome Suppression fonction cellules de Paneth
IRGM	Maturation du phagosome Autophagie induit par virus
NOD2	Sensing de bactéries intracellulaires Formation de l'autophagosome
IL-23R	Effet médié par l'IL-1 $\beta$
XIAP	Inhibiteur de l'autophagie
LRRK2	Dégradation autophagosomale-lysosomale
ULK1	Régulé par TORC1 et AMPK
VDR	Régule l'expression de NOD2
MTMR	Formation de l'autophagosome

### **3.3. Perturbations des fonctions liées à l'autophagie**

#### **3.3.1. Impact direct de la xénophagie dans les MICIs**

La xénophagie (Figure 12) est un terme donné au mécanisme de clairance des pathogènes médiée par l'autophagie (Gardet and Xavier, 2012). Les microorganismes capturés dans les autophagosomes sont dégradés suite à la fusion avec les lysosomes. Pour cela les microorganismes doivent être détectés pour initier la formation du phagosome. Les bactéries qui se sont échappées du phagosome peuvent être marquées par des cibles de dégradation, le principal mécanisme étant par l'attachement d'ubiquitine à leur surface (Levine et al., 2011), via l'action de E3 ligases (tel que LRSAM1, PARKIN et LUBAC). Cela induit aussi des signaux de danger et la reconnaissance de carbohydrates par la galectine 8 qui va immédiatement recruter le récepteur de l'autophagie NDP52 qui va se cibler dans le phagophore via l'interaction avec LC3. Cette étape peut être bloquée par certains facteurs bactériens ainsi que la fusion avec le lysosome, permettant l'échappement des bactéries.



**Figure 12: Les différentes étapes de la xénophagie (Kwon and Song, 2018)**

L'autophagie peut être induite par différents signaux en amont, incluant l'activation de récepteurs PRRs de l'immunité innée, tels que les TLRs (Toll-Like Receptors), NOD1 et NOD2 qui reconnaissent différents composants de la paroi des bactéries. NOD2 participe notamment au recrutement de l'ATG16L1, jouant un rôle clé dans les réponses immunitaires en réponse à l'invasion bactérienne médiée par la xénophagie. La présence de polymorphismes dans ces gènes, entraînant des défauts de réponse autophagique pourrait ainsi expliquer la dysbiose microbienne ainsi que la colonisation de certaines bactéries pathogènes fréquemment associées aux muqueuses chez les patients atteints de MICI, tels que les *E. coli* adhérents-invasifs (AIEC) et *S. typhimurium* (Elliott et al., 2015; Fujita et al., 2013; Lapaquette et al., 2010) (Figure 12). De façon intéressante, l'infection par les AIEC induit dans les entérocytes une augmentation des microARNs capables de réduire les niveaux d'ATG5 et ATG16L1 et de ce fait d'inhiber l'autophagie. Dans les biopsies de patients MC, une corrélation inverse entre les niveaux de ces microARNs et ceux d'ATG5 et ATG16L1 sont observés (Nguyen et al., 2014). Il peut donc être envisagé que la pathogénèse de la MC soit liée à une perte de la régulation fine de l'autophagie par les microARNs.



### 3.3.2. Fonctions des cellules de Paneth

Il a été montré que l'autophagie et certains gènes impliqués dans le processus ont un rôle spécifique dans la biologie et la fonction des cellules de Paneth. Cadwell *et al.* ont révélé que les cellules de Paneth déficientes pour *Atg16l1*, *Atg5* et *Atg7* présentent peu de granules et des quantités réduites de protéines et de peptides antimicrobiens. Ces cellules ont également une déficience dans la voie d'exocytose des granules au travers desquelles les peptides antimicrobiens et autres protéines qu'elles contiennent sont normalement sécrétés dans la lumière intestinale (Cadwell et al., 2009). De même, les patients atteints de MC qui portent l'allèle variant ATG16L1 T300A présentent des anomalies morphologiques et granulaires des cellules de Paneth, similaires à celles observées chez les souris déficientes dans les gènes de l'autophagie. Une déficience globale d'*Atg4b* provoque aussi des altérations dans les cellules de Paneth, contenant moins de granules et moins de lysozyme. Les souris déficientes en *Atg4b* sont également plus sensibles à une colite induite par du DSS (Cabrera et al., 2013).

La sécrétion des peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth exerce une fonction protectrice vis-à-vis des pathogènes et impacte fortement sur la composition du microbiote intestinal (Bevins and Salzman, 2011; Salzman et al., 2010). Il a été démontré que les facteurs génétiques qui entraîne une dysbiose du microbiote peuvent perturber en même temps la fonction des cellules de Paneth et par conséquent, pourraient jouer un rôle important dans la pathogenèse de la MC (Hansen et al., 2010). En effet, l'altération du microbiote peut aggraver la colite induit par le DSS (Elinav et al., 2011). Ces travaux montrent donc l'importance de l'autophagie dans le maintien de l'intégrité des voies de sécrétion des cellules de Paneth.

Les cellules de Paneth déficientes en *Atg16L1* présentent également une augmentation d'expression de la lipoprotéine lipase, de l'apolipoprotéine A-IV, de l'adiponectine, de la leptine et de l'haptoglobine. La plupart de ces gènes sont directement impliqués dans l'inflammation. De façon similaire, l'expression des gènes qui codent pour la leptine et l'adiponectine sont augmentés chez les patients souffrant de MC. Les patients présentant cette mutation ont une augmentation des taux de leptine plasmatique (Cadwell et al., 2009, 2008; Deuring et al., 2014) et une sécrétion réduite de peptides anti-microbiens (Cadwell et al., 2010, 2008).

Le récepteur de la vitamine D (VDR) peut jouer aussi un rôle essentiel dans la régulation de l'autophagie au niveau de l'épithélium intestinal. Une étude a montré que la déficience en VDR dans les cellules épithéliales intestinale altère la capacité antimicrobienne des cellules de Paneth par la régulation négative d'Atg16L1 et de ce fait de la sécrétion de lysozyme, provoquant ainsi une susceptibilité accrue à la colite induite par le DSS (Wu et al., 2015). La présence de polymorphisme dans les gènes codant pour NOD2 et/ou la leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) perturbe la sécrétion des lysozymes par les cellules de Paneth, conduisant ainsi à l'échec du contrôle de l'invasion des pathogènes intracellulaires comme *Listeria monocytogenes* (Rocha et al., 2015).

A l'inverse une déficience en Atg7 ne modifie pas l'induction d'une colite par le DSS, suggérant que les défauts de l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales ne sont pas suffisants pour induire une sensibilité accrue à la colite aigue (Wittkopf et al., 2012).

### **3.3.3. Fonction de la barrière intestinale**

L'autophagie participe non seulement à limiter la réplication bactérienne mais également la dissémination ultérieure dans d'autres tissus (Benjamin et al., 2013; Lassen et al., 2014; Travassos et al., 2010). Une étude a en effet montré que l'induction de l'autophagie dans des cellules Caco-2 par déprivation en nutriments augmente la résistance transépithéliale et réduit la perméabilité paracellulaire, concomitante avec une réduction de la présence de la protéine de jonctions serrées Claudine 2 à la membrane (Nighot et al., 2015). Des résultats similaires ont montré que l'activation de l'autophagie entraîne une augmentation de la fonction barrière de l'épithélium, dépendante de la Claudine 2 (Hu et al., 2015). Comme décrit précédemment, la Claudine 2 semble jouer un rôle négatif dans les pathologies inflammatoires, effet qui pourrait être inhibé par l'activation de l'autophagie capable d'induire sa dégradation dans un autophagolysosome (Hu et al., 2015). Ces résultats mettent l'accent sur un mécanisme supplémentaire par lequel l'autophagie peut améliorer la fonction barrière. De nombreuses études sur l'autophagie des cellules intestinales épithéliales ont démontré le rôle fonctionnel d'ATG16L1. Un polymorphisme du gène *atg16l1* a été associé aux MC en altérant l'homéostasie épithéliale.

### **3.3.4. Fonction des cellules caliciformes**

Des études récentes ont révélé que l'autophagie peut contrôler la fonction des cellules caliciformes. Des souris déficientes pour certaines protéines de l'autophagie comme ATG5, ATG7 ou LC3 présentent une altération de la morphologie des cellules caliciformes, une

accumulation plus importante de mucines à l'intérieur des cellules et un défaut d'exocytose et donc de libération de mucines dans la lumière intestinale (Patel et al., 2013). Le processus d'autophagie semble contrôler la production de mucines au travers des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), eux-mêmes générés en partie via des vacuoles LC3-positives associées à des oxydases NADPH. Un défaut de mucus entraîne le développement de colite spontanée, et donc essentiel pour l'homéostasie intestinale (Heazlewood et al., 2008; Van der Sluis et al., 2006b). Des travaux similaires ont montré qu'une mutation ATG16L1 T300A entraîne également des défauts des cellules caliciformes (Lassen et al., 2014). Ces défauts du processus d'autophagie liés à l'altération de la sécrétion des mucines sont donc une voie de plus impliquées dans les difficultés à éliminer les pathogènes et maintenir l'homéostasie et les interactions hôte-microbe au niveau de l'intestin (Johansson and Hansson, 2014; Wlodarska et al., 2014). La régulation de l'autophagie dans les cellules caliciformes peut de ce fait fournir de nouvelles stratégies pour le traitement des MICIs.

### **3.3.5. Fonction de présentation antigénique**

Comme décrit précédemment, les DCs sont à l'interface entre le système immunitaire inné et adaptatif. Leur principale fonction est de présenter les antigènes aux lymphocytes via les deux principaux complexes CMH I et de CMH II. La déficience en autophagie interfère avec ce processus, comme cela a pu être démontré dans des modèles de souris déficientes en Atg5 (Lee et al., 2010; Tian et al., 2013). *In vitro*, les DCs de souris déficientes en Atg7 sont incapables de stimuler l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> lorsqu'elles sont exposées aux antigènes de *Toxoplasma gondii* (E. Liu et al., 2015). A l'inverse, d'autres études ont montré que la déficience en Atg16L1 chez la souris conduit à une augmentation de la stimulation des lymphocytes T par les DCs (Baxt and Xavier, 2015). L'autophagie médiée par NOD2 est nécessaire à la fois pour conduire à la dégradation des bactéries et à la génération des réponses T CD4<sup>+</sup> via le CMH-II. Un lien fort entre les défauts dans la présentation de l'antigène et les MICI chez l'homme a été observé. Chez l'homme, il a été démontré que les DCs de patients atteints de MC se caractérisent par des altérations du processus xénophagique et de leur fonction de présentation antigénique (Cooney et al., 2010). Les DCs isolées de patients atteints de MC présentant des polymorphismes en NOD2 ou ATG16L1 ont montré une altération de la présentation de l'antigène via le CMH II (Conway et al., 2013). Les résultats de ces études suggèrent que le dysfonctionnement de l'autophagie affecte non seulement l'efficacité de la présentation de l'antigène mais aussi son interaction avec les cellules T.

### 3.3.6. Régulation de l'inflammasome

À l'état d'homéostasie, les macrophages intestinaux jouent un rôle crucial dans la protection de l'intestin par la reconnaissance et l'élimination des micro-organismes pathogènes ainsi que des cellules apoptotiques (Müller et al., 2012). La diminution des macrophages entraîne une augmentation de la susceptibilité de la colite induite par le DSS chez la souris (Qualls et al., 2006). Inversement, il a été démontré que lors de la survenue d'une colite induite par le DSS chez la souris, une grande infiltration des monocytes et de macrophages pro-inflammatoires est observée, déclenchant ainsi une réaction inflammatoire et immunitaire, indiquant que la régulation des macrophages peut être vitale dans le traitement des MICIs (Zigmond et al., 2012). La pathogenèse et la progression des MICIs sont donc fortement liées à l'activation constante des réponses immunitaires au niveau intestinal, conduisant à la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, responsables de l'apparition des lésions dans les muqueuses (Talero et al., 2014).

Les macrophages, tout comme les DCs, sont capables de détecter les composants moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs) et aux signaux de danger (DAMPs) via la reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée, les PRR, permettant d'initier une réponse immunitaire rapide et efficace pour protéger l'organisme contre les agents pathogènes (Mazzini et al., 2014). Étant donné le rôle clé des interactions entre l'hôte et les microorganismes dans le tube digestif, il est essentiel de réguler correctement les signaux induits par l'interaction des PRR et des facteurs bactériens impliqués dans la sécrétion de cytokines. Les récepteurs de type NOD (NLR) au niveau cytoplasmique et les récepteurs Toll-like (TLR) présents notamment à la surface des cellules sont les deux principaux types de PRR (Talero et al., 2014). La signalisation par les TLRs semble être impliquée de façon plus ou moins directe dans les processus autophagique qui peut être augmentée par la co-stimulation des voies TLRs par des composants bactériens. NOD2 semble jouer un rôle critique dans le processus d'activation autophagique en favorisant le recrutement de l'ATG16L1 à la membrane plasmique à l'entrée du site d'infection bactérienne (Travassos et al., 2010). Certains membres de la famille NLRs (tel que NLRC4, NLRP3, NLRP1) appartenant au complexe de l'inflammasome, conduisent via l'adaptateur ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), à l'activation de la caspase-1 et la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 (Figure 13). Saitoh *et al.* ont été les premiers à montrer que l'autophagie peut réguler négativement l'activation de l'inflammasome, mettant en évidence une augmentation d'IL-1 $\beta$  mais également d'IL-18 après stimulation de cellules déficientes pour certains gènes de l'autophagie, tel que l'*ATG16L1* et l'*ATG* (Saitoh et al., 2008). Ces travaux ont montré que cela était corrélé à une augmentation de l'activation de la caspase-1, ce qui

a été ensuite validé par de nombreuses études utilisant différents systèmes expérimentaux. Une altération de l'autophagie par *atg5*siRNA ou de la 3-méthyl adénine (3-MA) a conduit à l'initiation et l'activation plus forte de l'inflammasome médiée par NLRP3 combinée à une augmentation de l'activation de la caspase-1 et de la production d'IL-1 $\beta$  dans des macrophages péritonéaux traités par du LPS ou du DSS. En outre, l'utilisation de 3-MA pour inhiber l'autophagie *in vivo* a aggravé les symptômes de la colite induite par du DSS (Ke et al., 2016). De la même manière, les souris déficientes pour l'autophagie, présentent une augmentation des processus médiés par une augmentation de l'inflammasome (Harris et al., 2011). Une perte de fonction d'ATG16L1 entraîne également une élévation d'IL-1 $\beta$ , corrélée à une augmentation du récepteur SQSTM1/p62 (Lee et al., 2012). Des défauts d'ATG16L1 chez des patients atteints de MC indiquent également une augmentation d'IL-1 $\beta$  avec un statut hyper-inflammatoire (Plantinga et al., 2011).

L'activation de l'inflammasome peut-être régulée négativement par l'autophagie, par différents mécanismes. D'une part en ôtant les organelles endommagées, l'autophagie diminue le relargage de DAMPs dérivant des mitochondries et de ce fait diminue l'activation de l'inflammasome. Une perte d'autophagie résulte également en l'accumulation de ROS et de ce fait en une activation de l'inflammasome et une perte de l'homéostasie mitochondriale qui favorise la translocation de mtDNA, conduisant à une plus grande activation de la caspase-1 et donc de la production de cytokines pro-inflammatoires (Nakahira et al., 2011). Enfin, l'autophagie peut réguler directement l'activation et le relargage de l'IL-1 $\beta$  en séquestrant la pro-IL-1 $\beta$  dans les autophagosomes qui sera dégradée suite à un inducteur pharmacologique tel que la rapamycine (Harris et al., 2011).

A l'inverse, l'inflammasome peut également réguler l'autophagie. L'interaction des facteurs de l'autophagie avec les protéines NLR a été rapportée, montrant un mécanisme de régulation. Ces facteurs peuvent inhiber l'autophagie en séquestrant la becline-1, facteur initiateur de la formation de la double membrane autophagique via leur domaine NACHT (Jounai et al., 2011). Notamment NLRP4 présente une forte affinité pour la becline1 et cette interaction conduit à une inhibition du processus autophagique. NLRP3 peut aussi inhiber l'autophagie en diminuant les phosphatases et l'expression de la tensin homolog-induced putative kinase 1, un initiateur de la mitophagie.

L'autophagie semble donc représenter un nouveau dogme dans le domaine de la régulation de l'immunité innée. L'interrelation de l'inflammasome et de l'autophagie représente donc une balance importante entre d'une part les mécanismes de défense de l'hôte et d'autre part la régulation d'une inflammation excessive pour éviter les dommages tissulaires et l'inflammation chronique. Cette régulation est complexe et n'est pas encore parfaitement comprise. Elle semble dépendre du type cellulaire et des conditions spécifiques rencontrées (Sun et al., 2017).

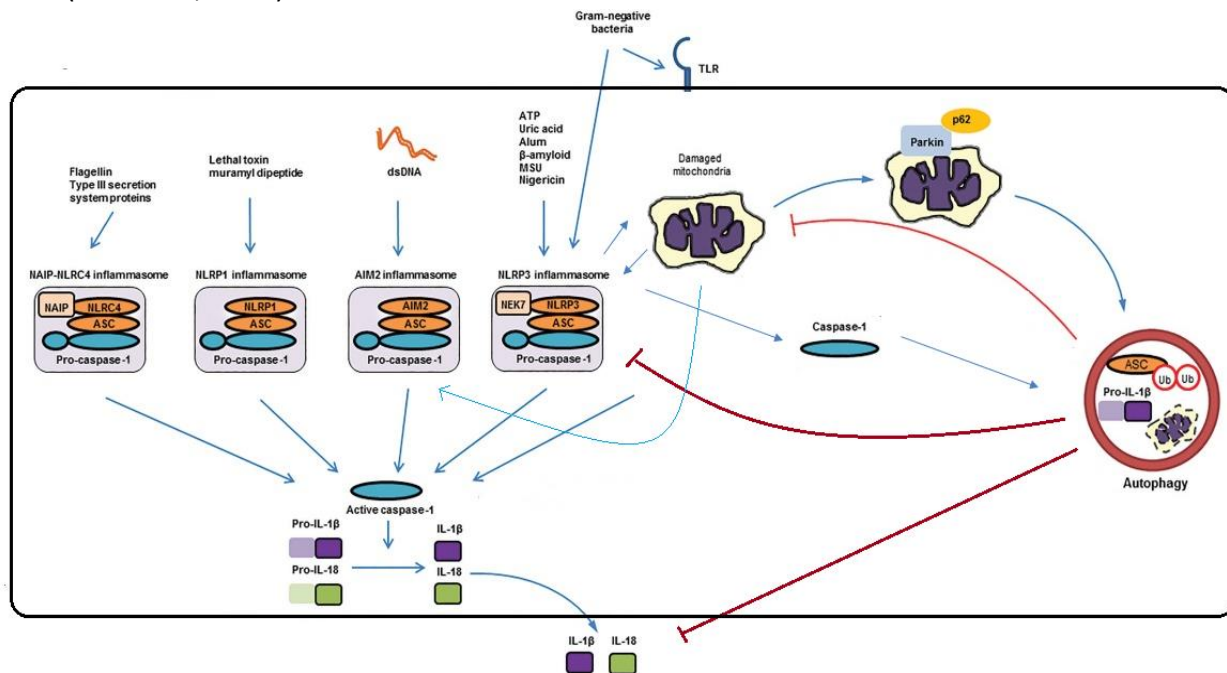


Figure 13: Voies d'activation de l'inflammasome et interregulation avec le processus d'autophagie et impact sur l'induction de cytokines pro-inflammatoires (d'après Sun *et al.*, 2017)

### 3.3.7. Impact sur le stress du reticulum endoplasmique (RE)

Le RE est un compartiment crucial pour les voies de sécrétion, facilitant la synthèse, la modification et la délivrance des protéines vers les membranes cellulaires et l'environnement extra-cellulaire. Divers stress et stimuli pathologiques peuvent altérer sa fonction et entraîner l'accumulation de protéines mal repliées, activant ainsi le système UPR (unfolded protein response) pour restaurer l'homéostasie. Ce type de stress peut affecter la fonction de diverses cellules de l'épithélium. Des travaux ont montré un lien entre l'autophagie et le stress du RE. Des défauts de blocage des réponses induisant le stress du RE ont été observés chez des souris déficientes pour *atg16L1* ou *atg7*, conduisant à une iléite spontanée sévère (Adolph et al., 2013). Des marqueurs de stress du RE sont significativement plus élevés chez des patients souffrant de MC présentant un

polymorphisme *atg16l1* (Deuring et al., 2014). De plus des patients présentant une augmentation de marqueurs du stress du RE au niveau des biopsies iléales, présentent une augmentation de l'incidence d'infection par les AIECs et une augmentation des facteurs de risque de pathologies iléales nécessitant une chirurgie (Deuring et al., 2014).

L'autophagie est donc un processus complexe jouant un rôle essentiel non seulement dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, mais également de l'homéostasie immunitaire et intestinale en exerçant un mécanisme de contrôle direct de la prolifération bactérienne, en stimulant les défenses anti-microbiennes des cellules de Paneth, en renforçant la barrière intestinale et la production de mucus, en régulant l'immunité innée et adaptative et l'inflammasome, ainsi que le stress oxydatif. Son dysfonctionnement peut donc conduire à de nombreuses pathologies dont les MICI, en particulier la MC qui est fréquemment associée à des polymorphismes dans les gènes impliqués dans son contrôle. Il explique également les dysbioses du microbiote observées (Figure 14).

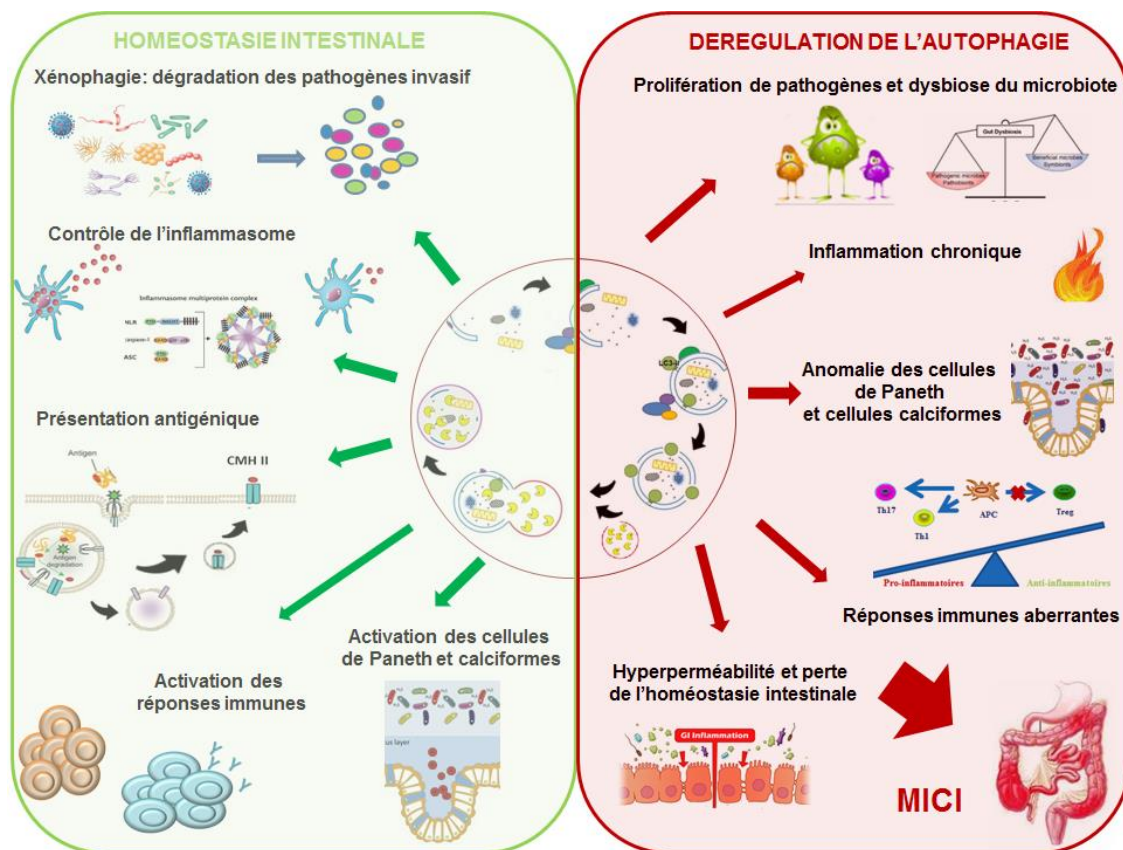


Figure 14: Rôle de l'autophagie dans le contrôle de l'immunité et de l'homéostasie intestinale et conséquences de sa dérégulation au cours des MICI (d'après Lapaquette et al., 2017)

## Chapitre 4 : Les probiotiques et leur impact dans les MICI

### 4.1. Historique et définition

Certains micro-organismes, principalement les bactéries lactiques, sont utilisés depuis de nombreux siècles pour conserver les aliments, malgré une méconnaissance du processus impliqué qui n'a été découvert qu'au siècle dernier. Louis Pasteur a notamment pu mettre en évidence le processus de fermentation et a été l'un des premiers à soutenir l'idée que les micro-organismes sont importants pour le maintien de la santé. C'est cependant Elie Metchnikoff (1845-1916), un scientifique russe travaillant à l'Institut Pasteur à Paris qui a attiré l'attention sur les effets bénéfiques de yogourts fermentés pour la santé. Son hypothèse était que des bactéries lactiques qui sont impliquées dans la fabrication des yogourts peuvent inhiber les microbes nuisibles présents dans l'intestin. Cette découverte peut être considérée comme la naissance du terme « microbes bénéfiques » qui a ultérieurement évolué vers le terme « probiotique », dérivé du mot grec signifiant « pour la vie ».

La définition du terme « probiotique » a d'abord été proposée par Lilly et Stillwell en 1965 pour décrire les substances sécrétées par un micro-organisme qui stimulent la croissance d'un autre organisme et améliorent l'équilibre de la flore intestinale (Lilly and Stillwell, 1965). La définition a ensuite évolué et Roy Fuller a redéfini en 1989 les probiotiques « comme des compléments alimentaires microbiens ayant des effets bénéfiques sur l'hôte par l'amélioration de l'équilibre microbien intestinal » (Fuller, 1989). La définition actuelle repose sur celle établie en juillet 2002 par un groupe d'experts réunis par la *Food and Agriculture Organisation (FAO)* des Nations Unies et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice sur la santé de l'hôte ». Depuis 2009, dans plusieurs rapports, l'EFSA a estimé que les souches déjà sur le marché n'étaient pas assez caractérisées et/ou que les allégations santé utilisées pour les préparations probiotiques manquaient de preuves scientifiques validées par des études cliniques.

L'utilisation des probiotiques est néanmoins de plus en plus reconnue en tant que nouvelles stratégies de prévention ou de traitement pour diverses maladies gastro-intestinales (diarrhée infectieuse, MICI, etc ...). Il a été démontré que certaines souches de bactéries lactiques peuvent exercer des effets bénéfiques sur la santé notamment dans le contexte de l'obésité, de l'allergie, ou d'intolérance au lactose, mais peuvent aussi être utilisés pour la santé bucco-dentaire, la nutrition sportive, la malnutrition infantile, voire même dans la préparation de cosmétiques. Cependant, ces effets sont variables en fonction des souches



utilisées. De plus, les mécanismes moléculaires impliqués restent mal compris (Oelschlaeger, 2010; Senok et al., 2005).

## 4.2. Sources des probiotiques

Les produits laitiers présentent une bonne source de probiotiques (Ugarte et al., 2006; Zago et al., 2011). Dans ce contexte, les bactéries lactiques, les bifidobactéries et autres micro-organismes obtenus à partir du lait fermenté sont utilisés depuis des siècles. La fermentation spontanée du lait a une longue histoire dans différentes régions de Mongolie ou d'Afrique, et l'utilisation de micro-organismes bénéfiques dans les produits laitiers fermentés est reconnue depuis de nombreuses générations (Yu et al., 2011).

Les probiotiques sont majoritairement isolés à partir du tractus gastro-intestinal humain et animal. Plus de 200 espèces bactériennes différentes résident dans l'intestin des adultes, mais également de nombreuses souches intéressantes sont retrouvées chez les nouveau-nés et les enfants. En effet, de nombreuses souches probiotiques utilisées aujourd'hui ont été isolées à partir de cette source (Ryan et al., 2008). En outre, il a été rapporté qu'une souche de l'espèce *L. fermentum*, isolée à partir d'échantillons de biopsies de la muqueuse colique humaine, possède des activités antimicrobiennes contre les pathogènes d'origine alimentaire (Varma et al., 2010). La plupart des souches probiotiques, telles que *B. longum* (Srůtková et al., 2011) et *L. acidophilus* RY2 (Lin et al., 2009), ont été isolées à partir des échantillons fécaux d'adultes et de nourrissons en bonne santé, respectivement.

L'isolement des probiotiques ne se limite pas au tractus gastro-intestinal humain. Le microbiote vaginal a été largement étudié comme un écosystème dont la composition normale aide à protéger contre les agents pathogènes envahissants responsables d'infections urinaires ou de maladies sexuellement transmissibles. Les lactobacilles sont les espèces prédominantes observées dans l'écosystème vaginal sain. La prédominance des lactobacilles dans le microbiote vaginal sain et son appauvrissement dans la vaginose bactérienne a donné naissance au concept de souches de *Lactobacillus* ou de *Bifidobacterium* protectrices de cet écosystème. De plus, le terme « probiotiques vaginaux » a été évoqué notamment pour le traitement et la prévention de cette infection (Mastromarino et al., 2013).

Il a été observé que le lait maternel n'est pas stérile, ce qui soulève la possibilité que le lait maternel abrite un inoculum bactérien naturel (West et al., 1979). Les bactéries présentes dans le lait maternel ont longtemps été considérées comme une conséquence d'une contamination cutanée ou fécale. Les lactobacilles présents dans le lait humain sont

génomiquement différents de ceux isolés de la peau (Martín et al., 2009; O'Hara and Shanahan, 2006), et les souches de LAB présentes dans le lait maternel ont également été observées dans les fèces des nourrissons correspondants (Martín et al., 2003). Il a ainsi été suggéré que le lait maternel constitue une source intéressante de probiotiques (Arboleya et al., 2012). Plusieurs études ont proposé que les lactobacilles isolés du lait maternel constituent une alternative efficace aux antibiotiques couramment prescrits pour le traitement de la mammites infectieuse pendant l'allaitement (Arroyo et al., 2010). De plus, il a été rapporté que deux souches de lactobacilles isolées à partir du lait maternel augmentent les réponses immunitaires naturelles et acquises grâce à l'activation des sous-populations de lymphocytes T et à l'expansion des lymphocytes T régulateurs (Pérez-Cano et al., 2010). Les bifidobactéries isolées à partir du lait maternel sont connues pour jouer un rôle crucial dans la prévention d'une variété de maladies à médiation immunitaire telles que l'allergie et les MICIs (Klement et al., 2004; Martín et al., 2009).

### **4.3. Caractéristiques des probiotiques**

Plusieurs espèces microbiennes sont actuellement considérées comme probiotiques (Tableau 3). Ces souches doivent présenter des caractéristiques bien précises. Les caractères probiotiques sont divisés en deux catégories : caractères généraux et caractères spécifiques (Hill et al., 2014). La caractérisation phénotypique et génotypique, le caractère d'innocuité, la résistance aux conditions du transit digestif ainsi que l'implantation efficace dans l'écosystème intestinal (formation de biofilm) correspondent aux caractères probiotiques généraux d'une souche microbienne. Les caractères spécifiques d'une souche probiotiques se traduisent par les divers effets bénéfiques sur l'hôte ainsi que le(s) mode(s) d'action impliqué(s).

**Tableau 3: Principaux micro-organismes utilisés comme probiotiques (Holzapfel et al., 2001).**

<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Bifidobacterium</i></b>	<b>Autres bactéries lactiques</b>	<b>Autres micro-organismes</b>
<i>L. acidophilus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. farciminis</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. sakei</i>	<i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. lactis</i> <i>B. thermophilum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus acidolactici</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>E. coli</i> Nissle 1917 <i>Propionibacterium freudenreichii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces Boulardii</i>

#### **4.3.1. Caractères généraux des souches probiotiques**

Une souche probiotique doit être parfaitement caractérisée sur le plan phénotypique et génotypique, dénuée de pathogénicité et ne pas porter de gènes de résistance aux antibiotiques ou codant des facteurs de virulence. C'est pour cela que la majorité des souches utilisées chez l'homme et l'animal sont retrouvées parmi les micro-organismes possédant le statut « GRAS » (Generally Recognized as Safe, FDA) ou « QPS » (Qualified Presumption of Safety, EFSA) et sont représentées majoritairement par des bactéries à Gram positif notamment des bactéries lactiques (LAB) (Kleerebezem and Vaughan, 2009). Les LAB sont utilisées depuis des millénaires dans les produits fermentés ce qui rend leur utilisation très sûre pour la santé de l'homme. Dans ce contexte, les espèces appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Bifidobacterium* sont les plus couramment utilisées comme probiotiques (Seale and Millar, 2013; Vankerckhoven et al., 2008). D'autre part, une souche d'*E. coli*, la souche *E. coli* Nissle 1917, et quelques souches du genre *Bacillus* ont été également retenues comme souches probiotiques. De plus, certaines levures telles que

l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, utilisées aussi depuis des milliers d'années comme des agents de fermentation, sont aussi considérées comme des microbes bénéfiques pour les êtres vivants (Alvarez-Olmos and Oberhelman, 2001; Holzapfel et al., 2001) (Tableau 3). *S. cerevisiae* variété *bouardii* est notamment connue pour ses effets préventifs dans les diarrhées post antibiothérapie (Ultra-levure).

L'identification microbienne a évolué au cours du temps. L'identification phénotypique était la seule méthode disponible pour identifier un agent microbien. Ce type d'identification peut donner un résultat au niveau du genre microbien mais reste difficile pour déterminer certaines d'espèce. L'identification moléculaire devient la plus pertinente et spécifique pour la sélection des souches probiotiques (Laulund et al., 2017). Basées sur le séquençage du gène 16S rDNA ou le séquençage du génome complet par la méthode NGS, ces méthodes sont recommandées par des organisations tels que IPA Europe, ISAPP ou par des administrations nationales (Laulund et al., 2017) ainsi que par beaucoup d'institutions qui développent et commercialisent les nouvelles souches probiotiques (Al Kassaa et al., 2014).

Une souche probiotique, qui exerce un effet bénéfique pour l'hôte, devra être capable de résister aux différents conditions de stress qu'elle va rencontrer avant d'arriver jusqu'à l'écosystème intestinal, notamment après administration orale. Les probiotiques doivent résister à plusieurs facteurs de stress rencontrés, notamment l'effet de l'acide gastrique (pH acide), l'action des sels biliaires et enzymes gastro-intestinaux (pepsine, pancréatine..), du péristaltisme intestinal, des peptides antimicrobiens sécrétés par les entérocytes ainsi que par les autres micro-organismes du microbiote intestinal. Il est également suggéré que la souche probiotique soit capable d'adhérer à la muqueuses intestinale ou de former des biofilms afin de mieux persister, mais, pour des raisons de sécurité, ce critère reste controversé (Butel, 2014; Dunne et al., 2001; Russell, 2009; Saarela et al., 2000). La résistance aux antibiotiques des probiotiques est l'un des débats les plus importants dans ce domaine. Elle peut aider les probiotiques à résister à certaines conditions, en particulier lorsque les patients prennent des antibiotiques au cours d'infections. Cependant, l'augmentation de la résistance aux antibiotiques des souches probiotiques a conduit à la nécessité d'une évaluation plus poussée des souches (Sharma et al., 2014). Les probiotiques ont le risque théorique de transférer des gènes de résistance aux antibiotiques à des bactéries pathogènes. De nombreuses souches de *Lactobacillus* sont naturellement résistantes à la vancomycine, ce qui soulève des inquiétudes quant au transfert possible d'une telle résistance à des organismes plus pathogènes, en particulier les entérocoques et *Staphylococcus aureus*. Pour cette raison, il est impératif que les probiotiques soient bien documentés, et bien étudiés, notamment pour leur capacité à transférer des déterminants

de résistance aux antibiotiques (Sharma et al., 2014). Des souches portant des résistances à des antibiotiques transférables ne sont pas autorisés sur le marché (Laulund et al., 2017).

Une souche probiotique doit également être stable au cours du procédé de production et de conservation. Selon la définition, les micro-organismes doivent être vivants, cependant certaines préparations inactivées peuvent présenter des effets intéressants. La survie et l'effet protecteur reste néanmoins dépendant de la souche elle-même et de la dose ingérée, ainsi que de l'hôte et de la matrice. Une souche probiotique doit répondre à des critères réglementaires avant d'être commercialisée, notamment sur la qualité et la quantité des bactéries ingérées. La dose a été fixée autour de  $10^9$  UFC/g, mais la dose précise nécessaire pour assurer un effet bénéfique va dépendre de la souche, de l'hôte et de l'effet recherché et ne peut être déterminée qu'après une étude clinique (Ghadimi et al., 2008). Pour satisfaire à la demande, la culture des micro-organismes probiotiques doit être effectuée dans des milieux ne contenant pas de composés d'origine animale, mais à partir de milieux à base de produits végétaux. Les paramètres tels que la température, le pH, la vitesse d'agitation, le type de neutralisant utilisé pour la régulation du pH et la pression d'oxygène doivent être contrôlés. Il faudra ensuite vérifier la stabilité des souches après les procédés de déshydratation (lyophilisation, atomisation...) afin qu'elle puisse satisfaire à la durée de vie généralement acceptée (30 jours).

#### **4.3.2. Caractères spécifiques des souches probiotiques**

La définition même d'un probiotique repose sur ses capacités bénéfiques sur la santé de l'hôte quel que soit leur mécanisme d'action. Les probiotiques peuvent être divisés en plusieurs catégories selon leurs effets et leurs modes d'action. Ceux-ci doivent donc préférentiellement être évalués par diverses études fonctionnelles à l'aide de modèles *in vitro*, de modèles expérimentaux *in vivo*, avant d'être confirmés par une étude clinique adaptée. De nombreux effets ont été attribués au probiotiques :

##### **- Amélioration de l'intolérance au lactose**

Plus de 60% de la population humaine à une capacité réduite à digérer le lactose en raison de la faible activité enzymatique de la lactase. Des études cliniques ont montré que les bactéries probiotiques présentes dans les produits laitiers fermentés et non fermentés peuvent être utilisées pour diminuer les symptômes cliniques de l'intolérance au lactose (Oak and Jha, 2018). Une amélioration de la digestion du lactose et la baisse des symptômes de l'intolérance a été obtenue avec une souche de *L. rhamnosus* (Ibarra et al., 2012). Une étude réalisée par Agustina *et al.* en 2007 a montré que la durée de la diarrhée était significativement diminuée dans le groupe ayant reçu le probiotique par rapport au groupe témoin parmi 58 sujets souffrant d'intolérance au lactose (Agustina et al., 2007). Une étude

de Zhong *et al.* a montré que les symptômes de l'intolérance au lactose étaient significativement diminués après la supplémentation en *B. animalis* (Zhong *et al.*, 2006). Cette application est actuellement la seule application santé reconnu par l'EFSA (ESFA, 2010).

- **Protection contre les infections gastro-intestinales (diarrhée du voyageur, diarrhée infantile, diarrhée induite par antibiotiques ...), infections à *Helicobacter pylori*** (Nista *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004) **et infections uro-génitales** (Mezzasalma *et al.*, 2017).

### ***Les diarrhées post antibiothérapie***

L'incidence de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques varie entre 5% et 30% (Bartlett, 1996). L'utilisation d'antibiotiques conduit en effet à des changements importants au niveau du microbiote intestinal, notamment à la diminution du nombre total des bactéries et de leur diversité avec une diminution de *Bacteroides*, bifidobacteria et l'augmentation des fusobacteria, clostridia et eubacteria (Mueller *et al.*, 2006). Cependant cette modification est souvent transitoire, le microbiote étant résilient. Une diminution de la production d'acides gras à chaîne courte dans l'intestin ainsi qu'une augmentation d'activité protéolytique ont également été observées chez des patients âgés traités par antibiotiques (Guigoz *et al.*, 2008). Les probiotiques donnés en association avec des antibiotiques sont largement utilisés pour la prévention de la diarrhée chez les adultes et les enfants (Blaabjerg *et al.*, 2017). Plusieurs études cliniques ont été menées avec *S. boulardii* pour la prévention de diarrhée associée aux antibiotiques (Can *et al.*, 2006; Szajewska *et al.*, 2006; Szajewska and Kołodziej, 2015). D'autres études cliniques contrôlées randomisées ont également montré l'efficacité de *L. rhamnosus* GG chez les adultes (Thomas *et al.*, 2001; Wenus *et al.*, 2008) ainsi que chez les enfants (Arvola *et al.*, 1999; Vanderhoof *et al.*, 1999). Une étude récente remet cependant en cause l'effet potentiel des probiotiques. Cependant cette étude a été réalisée à l'aide d'un mélange dont les effets n'ont pas été démontrés par des études cliniques, et elle n'a concerné que 8 personnes et n'a mesuré aucun paramètre clinique (Suez *et al.*, 2018). Des méta-analyses et des revues Cochrane confirment d'ailleurs ces effets préventifs (Blaabjerg *et al.*, 2017; Goldenberg *et al.*, 2017, 2015) et montrent un impact positif substantiel sur les budgets de la sécurité sociale potentiel (Lenoir-Wijnkoop *et al.*, 2014).

### ***Diarrhées infectieuses***

Le traitement et la prévention des diarrhées infectieuses sont parmi les effets bénéfiques les plus attribués aux probiotiques. Les diarrhées infectieuses sont causées par des pathogènes viraux, bactériens ainsi que par des protozoaires. Différentes études ont montré que certaines souches probiotiques peuvent inhiber des virus entériques ce qui les rendent efficaces dans le traitement des diarrhées infectieuses infantiles (Gou *et al.*, 2014;

Guandalini, 2008). Le rotavirus correspond au virus fréquemment responsable des diarrhées infantiles aiguës (John et al., 2014). Des études cliniques ont montré que des souches probiotiques tels que *L. rhamnosus* GG (LGG), *L. casei* Shirota (LcS) et *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 peuvent diminuer la durée de la diarrhée aiguë causé par ce virus (Shah, 2007). L'effet antiviral des probiotiques peut être médié par plusieurs mécanismes (Kassaa, 2017). Cela peut être dû à la sécrétion d'agents antiviraux telles que des bactériocines, des effets immunomodulateurs, l'inhibition directe ou la neutralisation des virus. Concernant les enteropathogènes bactériens, *Clostridium difficile* est la bactérie la plus néfaste retrouvée après une antibiothérapie. *C. difficile* provoque des infections gastro-intestinales accompagnées de diarrhée et de colite pseudomembraneuse (Allen, 2014). Certains probiotiques ont montré une capacité protectrice et un meilleur rétablissement dans les entérites causées par *C. difficile* (Goldenberg et al., 2017; Naaber et al., 2004; Qamar et al., 2001).

### **Probiotiques et pancréatite aiguë**

Les probiotiques peuvent jouer un rôle important dans la prévention des complications de la pancréatite aiguë expérimentale en réduisant la translocation bactérienne (Akyol et al., 2003; Muftuoglu et al., 2006; van Minnen et al., 2007). Une étude clinique menée par Olah *et al.* sur des patients atteints de pancréatite aiguë avec la souche *L. plantarum* 299v associée à de la fibre d'avoine a montré une réduction significative de la nécrose pancréatique et du nombre d'interventions chirurgicales (Oláh et al., 2002). Par la suite, plusieurs études ont rapporté des effets positifs similaires avec des probiotiques associés ou non à des prébiotiques (Gou et al., 2014; Karakan et al., 2007; Qin et al., 2008).

La liste des bénéfices des probiotiques ne se limite pas à ceux mentionnés et inclut une gamme d'effets prometteurs qui nécessitent toutefois d'autres études chez l'homme pour être étayés. Ils diminuent également le risque de cancer colorectal (Rafter et al., 2007) et ils protègent des complications post-opératoires du by-pass (Woodard et al., 2009).

### **- Amélioration de la constipation**

La constipation fonctionnelle est un trouble gastro-intestinal basé sur des symptômes sans origine organique (par exemple, une occlusion intestinale). Il a une prévalence de 14% chez les adultes (Suarez and Ford, 2011), ce qui représente un important problème de santé publique, les symptômes pouvant être graves et entraîner un impact significatif sur la qualité de vie du patient. Les probiotiques peuvent améliorer le temps de transit intestinal, la fréquence des selles et la consistance des selles (Dimidi et al., 2014). Yoon *et al.* 2018 ont montré que les probiotiques amélioreraient significativement la consistance des selles chez les patients souffrant de constipation chronique. De plus, l'effet bénéfique de *L. plantarum* sur

la consistance des selles persiste après l'arrêt de la supplémentation en probiotiques (Yoon et al., 2018).

#### **- Prévention contre les entérocolites ulcéro-nécrosantes chez le prématuré**

L'entérocolite nécrosante est l'urgence gastro-intestinale la plus fréquente chez le nouveau-né prématuré. Certains rapports estiment une incidence de plus de 10% chez les nourrissons pesant moins de 1500 g, avec une mortalité avoisinant les 30%. De nouvelles preuves suggèrent que les probiotiques pourraient jouer un rôle dans le contrôle ou la prévention de cette pathologie en réduisant la colonisation intestinale par des microorganismes pathogènes, en renforçant la barrière intestinale et en atténuant l'inflammation intestinale (AlFaleh and Anabrees, 2014). Par exemple Hoyos *et al.* ont montré que l'administration entérale de *Lactobacillus acidophilus* et de *Bifidobacterium infantis* aux nouveau-nés dans une unité de soins intensifs a réduit significativement l'incidence de l'entérocolite nécrosante (Hoyos, 1999).

#### **- Stimulation du système immunitaire et prévention des maladies hivernales et pathologies allergiques**

Turchet *et al.* ont montré que l'administration de *L. casei* DN-114001 induit une réduction de 20% de la durée des infections hivernales (Turchet et al., 2003). Cazzola *et al.* suggère qu'une supplémentation de 3 mois avec *L. helveticus* R0052, *B. infantis* R0033, *B. bifidum* R0071 et un fructooligosaccharide peut réduire le risque d'apparition de maladies infectieuses courantes chez les enfants et limite le risque d'absentéisme à l'école (Cazzola et al., 2010).

Des recherches récentes suggèrent que l'exposition à des bactéries au début de la vie peut jouer un rôle protecteur contre les allergies même lorsque la barrière muqueuse et le système immunitaire sont encore immatures (Rook and Brunet, 2005). Dans ce contexte, les probiotiques peuvent fournir une stimulation microbienne alternative nécessaire au développement du système immunitaire chez les nourrissons. Les probiotiques améliorent également la fonction « barrière » de la muqueuse, une propriété qui est considérée comme clé dans la modulation de la réponse allergique. L'administration à des mères présentant un fort niveau d'antécédents familiaux d'eczéma, de rhinite allergique ou d'asthme de la souche *L. rhamnosus* GG a permis de prévenir la survenue d'eczéma atopique chez les nourrissons à haut risque suite à une administration aux mères à court- (Isolauri et al., 2000), ou plus long terme (Kalliomäki et al., 2007). La souche *L. acidophilus* n'était pas capable de produire le même résultat dans une étude différente suggérant la spécificité de la souche (Taylor et al., 2006). *L. rhamnosus* GG en association avec *B. animalis* subsp. *lactis* pendant la grossesse et l'allaitement réduit le risque et la gravité d'eczéma atopique et de sensibilisation allergique chez l'enfant (Huurre et al., 2008), alors qu'un autre mélange de



probiotiques (*L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *B. breve* et *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS) n'a pas conduit à des résultats probants (Viljanen et al., 2005). En ce qui concerne l'allergie alimentaire, l'utilisation de préparations probiotiques chez des adultes présentant une hypersensibilité au lait - et non une intolérance au lactose - a montré que certaines souches peuvent inhiber la réponse inflammatoire induite par le lait et améliorer les symptômes d'allergie (Trapp et al., 1993).

#### **- Traitement des pathologies métaboliques (obésité, diabète, NASH)**

L'obésité est l'un des problèmes de santé publique les plus importants au niveau mondial, tant dans les pays développés que dans les pays émergents. Elle se caractérise par un excès anormal de tissu adipeux blanc, et une inflammation de bas grade, facteur de risque majeur de développement du diabète de type 2, de maladies cardiovasculaires et de cancer (Bass and Eneli, 2015). L'obésité est également associée à une modification de la composition du microbiote. On observe notamment un changement entre l'abondance des deux phyla principaux, Bacteroidetes et Firmicutes et une diminution de la diversité microbienne, en particulier des bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte, ce qui peut avoir une influence sur l'équilibre énergétique et le contrôle de la satiété (Forslund et al., 2015; Qin et al., 2012; Turnbaugh et al., 2009). Dans ce contexte, l'effet potentiel de probiotiques a été étudié et des effets intéressants ont été mis en évidence dans différentes études expérimentales (Wang et al., 2015; Yadav et al., 2013), dont celles effectuées par mon laboratoire d'accueil (Alard et al., 2016). Chez l'homme, peu d'études probantes ont été rapportées. L'administration de la souche *L. gasseri* SBT2055 à des sujets obèses japonais pendant 12 semaines a montré une réduction de l'indice de masse corporelle et de la masse de graisse abdominale (Kadooka et al., 2013, 2010). L'administration d'un mélange contenant les souches *L. acidophilus* La5, *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 et *L. casei* DN001 chez des individus ayant un indice de masse corporelle élevée, a conduit à une réduction de cet indice, ainsi que du pourcentage de graisse et du taux de leptine (Zarrati et al., 2014, 2013). L'administration de capsules contenant des bifidobactéries, des lactobacilles et une souche de *S. thermophilus* chez des sujets en surpoids a également conduit à une amélioration significative de leurs profils lipidiques, réduisant les taux de cholestérol total, de triacylglycérols et de LDL-C et augmentant les taux de HDL (Rajkumar et al., 2014). Des données récentes suggèrent que des modifications de la composition du microbiote intestinal sont aussi associées au développement du diabète de type 2 (Han and Lin, 2014; Hulston et al., 2015; Larsen et al., 2010). L'administration de *L. acidophilus* La-5 et *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 chez des patients atteints de diabète de type 2 a mis en évidence une différence significative entre les groupes traités ou non, concernant les taux moyens de l'HbA1c, du cholestérol total et de LDL-C (Tonucci et al., 2017). Une augmentation des taux de HDL-C et une diminution du rapport LDL-C / HDL-C a été rapportée par Mohamadshahi *et al.* (Mohamadshahi et al., 2014). Des études antérieures

utilisant les mêmes souches (Ejtahed et al., 2012, 2011) réalisées chez des patients atteints de diabète de type 2 ont signalé une diminution significative de la glycémie à jeun, des taux de cholestérol total, de LDL-C et de HbA1c, ainsi qu'une augmentation de l'activité du superoxyde dismutase érythrocytaire, de la glutathion peroxydase et du statut antioxydant total par rapport au groupe témoin.

La stéatose hépatique non alcoolique (NASH) est la pathologie hépatique la plus répandue dans le monde et touche à la fois les adultes et des enfants. Elle est caractérisée par une accumulation excessive de graisse dans les cellules hépatiques (NAFLD), conduisant à des lésions et à un état inflammatoire sévère pouvant progresser vers des lésions de type fibrose (NASH), puis à une cirrhose et potentiellement vers un cancer du foie. La NASH est souvent une conséquence de l'obésité. On observe tout comme pour l'obésité une modification du microbiote (Ley et al., 2006). L'augmentation de l'inflammation et du stress oxydatif associée à des dysbioses du microbiote participent au développement de cette pathologie. De ce fait, l'utilisation de probiotiques est proposée comme une stratégie intéressante. Des études expérimentales ont montré l'effet bénéfique de certaines souches, telle que *L. casei* strain Shirota dans un modèle murin lié à la consommation d'un régime déprivé en méthionine et choline (Okubo et al., 2013) et du mélange VSL#3 qui protège d'une NASH et de l'athérosclérose dans un modèle de dyslipidémie génétique (souris déficiente pour ApoE) traitées par du DSS (Mencarelli et al., 2012). Peu d'études cliniques ont été réalisées. Une étude pilote réalisée sur 30 patients souffrant de NAFLD a évalué les effets de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et de *S. thermophilus* sur différents paramètres de la fonction hépatique et des facteurs de risque cardiovasculaires. Ce traitement a révélé une diminution des taux d'alanine amino transférase (ALT), d'aspartate amino transférase (ASP) et de GTP en tant qu'indicateurs de l'amélioration de la fonction hépatique (Aller et al., 2011).

Un essai clinique contrôlé a été mené avec un yaourt probiotique contenant *L. acidophilus* La5 et *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 pendant 8 semaines chez des patients atteints de NASH. La consommation de ce mélange a entraîné une réduction des taux sériques d'ALT, d'ASP, de cholestérol total et de LDL-C par rapport au groupe témoin (Nabavi et al., 2014). Une étude récente réalisée avec un cocktail contenant des souches de *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaris*, *B. longum* et *S. thermophilus* chez 75 patients atteints de NASH a montré une réduction significative des taux d'ALT et cholestérol, de l'indice de masse corporelle et une amélioration de la dysbiose du microbiote (Manzhali et al., 2017).

### **- Réduction du risque de maladie coronarienne**

Les maladies cardiovasculaires sont une cause majeure de décès dans le monde et augmentent rapidement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Le taux élevé de C-

LDL est un facteur de risque majeur de maladie coronarienne et constitue la cible principale du traitement hypolipidémiant (Grundy, 2008). Des réductions significatives du LDL-C ont été observées après administration de quatre souches probiotiques: *L. reuteri* NCIMB 30242, *E. faecium* et l'association de *L. acidophilus* La5 et de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Ejtahed et al., 2011; Hlivak et al., 2005; Jones et al., 2012). Deux symbiotiques, *L. acidophilus* CHO-220 et inuline et *L. acidophilus* et fructo-oligosaccharides, ont également diminué les taux de LDL-C (Ooi et al., 2010; Schaafsma et al., 1998). L'administration de *L. reuteri* NCIMB 30242 a également amélioré les autres facteurs de risque, tels que les biomarqueurs inflammatoires.

#### **- Neutralisation de carcinogènes alimentaires et effet bénéfique dans le cancer colorectal**

Les probiotiques peuvent agir comme antimutagènes et exercer des effets positifs à différents stades de la cancérogenèse. Les effets peuvent être attribués aux facteurs suivants: (i) inactivation des mutagènes ou des carcinogènes, (ii) diminution du pH intestinal (iii) effet immunomodulateur, (iv) modulation du microbiote intestinal, (v) modulation de l'apoptose et de la différenciation cellulaire, et (vi) inhibition de la signalisation de la tyrosine kinase (Raman et al., 2013).

L'activité anticancéreuse du probiotique *Bacillus polyfermenticus* a été évaluée *in vitro* et *in vivo* et a été partiellement attribuée à la régulation négative de ErbB2 et ErbB3 nécessaire au développement de la tumeur (Ma et al., 2010). Chen et al. ont rapporté la prévention de la prolifération induite par EGF17 (Epidermal Growth Factor 17), la formation réduite de colonies cellulaires et la promotion de l'apoptose par *S. boulardii* *in vitro* et *in vivo* (Chen et al., 2009). Les probiotiques pouvant moduler la signalisation associée à l'initiation et à la prolifération du cancer, sont ainsi proposés comme nouvel agent thérapeutique et prophylactique dans la prévention du cancer colorectal.

#### **- Prise en charge des pathologies comportementales, tels que la maladie d'Alzheimer (Nimgampalle and Kuna, 2017), l'autisme (Shaaban et al., 2017), le stress et la dépression (Vlainić et al., 2016).**

La communication bidirectionnelle entre le cerveau et l'intestin, appelée axe intestin-cerveau, est reconnue depuis longtemps. Le cerveau peut agir sur le tractus gastro-intestinal en régulant la motilité, la sécrétion, l'absorption et la circulation sanguine. En même temps, l'intestin peut affecter le fonctionnement et le comportement du cerveau (Grenham et al., 2011). L'échafaudage de l'axe entre l'intestin et le cerveau comprend le tractus gastro-intestinal, le système nerveux central, le système nerveux autonome, le système nerveux entérique, le système neuroendocrinien et le système immunitaire cérébral (Grenham et al.,

2011). Des études récentes ont montré que le microbiote intestinal est impliqué dans le développement neurologique et diverses fonctions cérébrales en régulant l'axe intestin-cerveau (Carabotti et al., 2015; Erny et al., 2015). Les probiotiques ont récemment attiré l'attention dans ce contexte, étant donné qu'ils peuvent influencer de façon bénéfique le microbiote intestinal, ce qui pourrait agir sur l'axe intestin-cerveau (Bravo et al., 2012).

Une variété de probiotiques a été étudiée dans des modèles animaux de troubles neurologiques. *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* sont les principaux genres qui ont montré des effets bénéfiques dans ce type de pathologies, par exemple sur l'anxiété, la dépression ou le stress. Il a été montré que l'administration orale d'une formulation probiotique composée de *L. helveticus* R0052 et de *B. longum* R0175 pendant plus de 30 jours améliore l'humeur chez des volontaires généralement en bonne santé (Messaoudi et al., 2011a, 2011b). Nimgampalle et Kuna ont révélé que la souche *L. plantarum* MTCC1325 pourrait avoir des propriétés bénéfiques contre la maladie d'Alzheimer induite chez le rat par du D-galactose (Nimgampalle and Kuna, 2017).

#### **4.4. Mode d'action des probiotiques**

Les modes d'action des probiotiques sont multiples et complexes et varient d'une souche à l'autre et en fonction des applications recherchées.

##### **4.4.1. Modulation du microbiote intestinal**

Comme décrit précédemment, le microbiote joue un rôle crucial sur la santé et est altéré dans de nombreuses pathologies chroniques. Les études actuelles montrent de plus en plus que les effets bénéfiques de certains probiotiques sont associés à des rééquilibrages du microbiote, en restaurant la diversité et l'abondance de certaines bactéries reconnues comme étant bénéfiques (Azad et al., 2018).

##### **4.4.2. Immunomodulation (stimulation de l'immunité ou activité anti-inflammatoire)**

Récemment, le terme immunobiotique a été créé pour les souches probiotiques ayant un effet sur le système immunitaire. Les immunobiotiques peuvent stimuler ou moduler les

différentes réponses immunitaires. Cet effet semble être souche dépendante, puisque certaines souches peuvent stimuler les réponses pro-inflammatoire (Zelaya et al., 2016) tandis que d'autres souches peuvent réguler l'inflammation en stimulant les réponses anti-inflammatoires (Foligné et al., 2007a). Plusieurs études ont en effet montré que certaines souches probiotiques peuvent moduler le système immunitaire de la muqueuse et limiter l'inflammation par la production de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'interleukine IL-10 et TGF- $\beta$  (Donkor et al., 2012; Pérez-Cano et al., 2010) et inhiber la production des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et l'IL-8 (Ma et al., 2004; Petrof et al., 2004). De plus, les probiotiques ont la capacité d'interagir avec les cellules épithéliales et les DCs de l'hôte (Macho Fernandez et al., 2011; Zoumpopoulou et al., 2008) et favorisent la polarisation de réponse T régulatrices (Kwon et al., 2010). Ceci peut aisément être mis en évidence par la stimulation de cellules immunes *in vitro*, montrant des effets différents en fonction des souches. Il est ainsi possible de sélectionner des souches probiotiques stimulant la production de cytokine anti- inflammatoire telle que l'IL-10 et induisant peu de cytokine pro-Th1 (IL-12 ou IFN- $\gamma$ ). Les probiotiques peuvent influencer différemment la maturation des DCs et les profils de cytokines induites. La stimulation des DCs par la souche *L. salivarius* Ls33 induit une maturation partielle des DCs, tandis qu'une maturation totale et une production importante de cytokines comme IL-12 et IL-6 a été observée avec la souche *L. acidophilus* NCFM (Foligné et al., 2007a). De façon importante, les souches présentant des profils anti-inflammatoires *in vitro* sont capables de protéger les souris d'une colite expérimentale, ce qui représente des critères intéressants de sélection de souches pour une application dans les MICI (Alard et al., 2018; Burns et al., 2017; Foligné et al., 2007a; Zaylaa et al., 2018).

A l'inverse certains probiotiques sont capables de stimuler la production de l'IFN- $\gamma$  et d'IL-12, qui sont des cytokines pro-Th1 (Mohamadzadeh et al., 2005; Vissers et al., 2010) et de renforcer l'immunité innée (Villena et al., 2016). Ces souches seront préférentiellement sélectionnées pour des applications de stimulation de l'immunité et notamment pour limiter certaines infections, telle que des infections hivernales (Kechaou et al., 2013; Zelaya et al., 2016) ou pouvant servir d'adjuvant à des vaccins administrés par voie muqueuse (Vizoso-Pinto et al., 2017). Evrard *et al.* ont montré la capacité de la souche *L. rhamnosus* Lcr35 à induire de l'IL-23, un membre de la famille IL-12 associé à la différenciation Th17 et aux réponses pro-inflammatoires (Evrard et al., 2011). Certains lactobacilles ont également montré des capacités à diminuer la production des cytokines IL-4 et IL-5 qui sont des cytokines pro-Th2 impliqués notamment dans des réactions de type allergique (Ghadimi et al., 2008; Pochard et al., 2002).

### 4.4.3. Renforcement de la barrière intestinale

Un nombre limité d'études cliniques ont évalué l'impact des probiotiques sur l'intégrité de la barrière intestinale chez des sujets volontaires sains. Karczewski *et al.* ont néanmoins montré que la perfusion de volontaires sains par *L. plantarum* WCFS1 renforçait la localisation des protéines ZO-1 et occludines après interaction avec les bactéries. Ces données ont été confirmées dans un modèle *in vitro* utilisant la lignée Caco-2, montrant que l'effet était dépendant de TLR2 (Karczewski *et al.*, 2010). De nombreux modèles expérimentaux ont montré l'impact positif de probiotiques sur la restauration de la barrière, après diverses infections par des pathogènes (Bermudez-Brito *et al.*, 2015; Johnson-Henry *et al.*, 2005; Liévin-Le Moal *et al.*, 2002) ou dans des modèles de colite (Madsen *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2016). Certains probiotiques sont capables de renforcer la barrière intestinale en agissant sur les jonctions serrées et la production de mucus (Kumar *et al.*, 2017). Les travaux de Polk *et al.* ont mis en évidence *in vitro* le rôle de certaines protéines, telle que la P40 dérivée de *L. rhamnosus* GG, capable de prévenir la disruption de l'épithélium en induisant une signalisation via l'EGF (epidermal growth factor). Un facteur soluble de *B. infantis* a également permis l'augmentation de ZO-1 et des complexes occludine corrélée à une amélioration des fonctions barrière (Karczewski *et al.*, 2010).

Les probiotiques peuvent également limiter l'adhésion des pathogènes et leur translocation par l'occupation de niches. Certaines probiotiques sont également capables de produire des agents anti-microbiens, notamment des bactériocines, des enzymes ou des molécules simples avec des effets anti-bactériens, comme l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou les AGCC. Il a été démontré que des souches probiotiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* peuvent inhiber des pathogènes, y compris *Salmonella*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* et les rotavirus (Chenoll *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2012; Todoriki *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2008). L'exclusion compétitive par les bactéries intestinales est basée sur une interaction bactérie-bactérie médiée par la compétition pour les nutriments disponibles et pour les sites d'adhésion des muqueuses. Les bactéries peuvent également modifier leur environnement pour le rendre moins adapté à leurs concurrents. La production d'acides organiques permettant de diminuer le pH et donc la prolifération bactérienne, ou l'activation de cellules de Paneth capables de produire des peptides anti-microbiens (Fuochi *et al.*, 2017).

Les acides organiques produits par les souches probiotiques, surtout par les lactobacilles, en particulier l'acide acétique et l'acide lactique, ont un fort effet inhibiteur contre les bactéries à Gram négatif (Uro-pathogènes et entéro-pathogènes) et ont été considérés comme les principaux composés antimicrobiens responsables de l'activité inhibitrice des probiotiques

contre les pathogènes (tel que *Salmonella typhimurium*) (Cadieux et al., 2009; De Keersmaecker et al., 2006). Plusieurs souches probiotiques produisent des peptides antibactériens comme les bactériocines. Les bactériocines produites par des bactéries Gram-positif tel que la lactacine B de *L. acidophilus*, la plantaricine A de *L. plantarum* C11 et la nisine de *Lactococcus lactis* ont un spectre d'activité étendu, incluant notamment des effets contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Karska-Wysocki et al., 2010; Sand et al., 2013). Liévin *et al.* ont décrit une forte activité de destruction de deux souches de *Bifidobacterium* contre plusieurs bactéries pathogènes, dont *Salmonella typhimurium* SL1344 et *E. coli* C1845 (Liévin et al., 2000). Il est bien connu que certaines souches de probiotiques produisent des métabolites qui inhibent la croissance des champignons et d'autres espèces de bactéries (Coloretti et al., 2007; Lindgren and Dobrogosz, 1990). Certaines études ont montré que certaines souches de *Lactobacillus* peut produire des substances antifongiques, telles que l'acide benzoïque, la méthylhydantoïne, la mévalonolactone (Niku-Paavola et al., 1999; Prema et al., 2010) et les acides gras à chaîne courte (Sjögren et al., 2003).

De façon indirecte, les probiotiques peuvent inhiber les pathogènes en stimulant la production des PAM par les entérocytes, principalement par les cellules de Paneth. Les défensines et les cathélicidines sont les PAM les plus répondus dans la lumière intestinale, sécrétés par les cellules épithéliales intestinales et présentent une activité antimicrobienne contre une grande variété de bactéries, de champignons et de certains virus (Kelsall, 2008). Certaines souches probiotiques comme la souche *E. coli* DSM 17252 G2 et plusieurs lactobacilles, notamment le mélange VSL#3, ont montré une capacité à stimuler la production de défensines par les cellules de Paneth surtout la  $\beta$ -défensine 2 humaine (Möndel et al., 2009; Schlee et al., 2008; Wehkamp et al., 2004).

Des travaux récents indiquent que certains probiotiques pourraient renforcer la barrière en favorisant l'immunité innée et notamment l'activation de cellules de type ILC3 capables d'induire la secretion d'IL-22. Un métabolite produit par la souche *L. reuteri* D8 (indole-3-aldehyde) serait notamment impliqué dans ce mécanisme et pourrait stimuler la sécrétion d'IL-22 via l'activation de récepteur AhR (hydrocarbon receptor) et la phosphorylation de STAT3 (Hou et al., 2018).

#### - **Production d'acides gras à chaîne courte et de nutriments (vitamines)**

Les lactobacilles peuvent produire des AGCC par la dégradation et la fermentation de fibres alimentaires ou de produits finaux d'hydrates de carbone tels que le pyruvate (Pessione, 2012). Les bifidobactéries utilisent la voie de la fermentation pour produire principalement de l'acétate pendant la croissance sous limitation des glucides, ainsi que du lactate lorsque

les glucides sont en excès (Macfarlane and Macfarlane, 2003). Cette capacité à produire des AGCC à la fois par les lactobacilles et les bifidobactéries est mise en évidence lorsque la concentration en AGCC est analysée selon différentes compositions du microbiote. Par exemple, la supplémentation avec *L. salicinius* JCM 1230 et *L. agilis* JCM 1048 pendant 24 h ont montré une augmentation significative de la formation de propionate et de butyrate au niveau du caecum chez le poulet (Meimandipour et al., 2010). Il a été récemment montré que *L. acidophilus* CRL 1014 augmente la concentration en AGCC (Sivieri et al., 2013). LeBlanc *et al.* ont évalué la capacité de quatre probiotiques à produire des AGCC. *L. rhamnosus* GG a été capable de produire et de libérer du propionate, mais n'était pas capable de produire du butyrate ou de l'acétate. De la même façon, *B. longum* SP 07/3 et *B. bifidum* MF 20/5 ont pu produire et libérer une quantité significative d'acétate. *B. longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 et *L. gasseri* PA 16/8 ont été capables de produire et de libérer du propionate, mais n'ont pas été capables de produire du butyrate (LeBlanc et al., 2017). D'autre part, certains probiotiques ont la capacité de produire des nutriments, en particulier certaines vitamines. *L. fermentum* CECT5716 est capable de produire des vitamines B2 et B9 (Cárdenas et al., 2015). La production de vitamines n'a été démontrée dans des milieux de culture microbienne mais aucun essais cliniques n'a pu déterminer les concentrations sériques de vitamines chez les patients ayant reçu ce probiotique. LeBlanc *et al.* ont évalué le potentiel *in vitro* de production et de libération de vitamines B1 / B2 et B9 de quatre souches bactériennes probiotiques: *L. rhamnosus* GG, *B. longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 et *L. gasseri* PA. 16/8. Ils ont mis en évidence que *L. rhamnosus* GG était un bon producteur et libérateur de folate (B9) et de riboflavine (B2) et un producteur faible mais significatif de thiamine intracellulaire sans synthèse extracellulaire (LeBlanc et al., 2017).

#### - **Régulation du système neuroendocrine**

Des études scientifiques récentes ont mis en évidence les relations complexes entre le microbiote intestinal et l'axe intestin-cerveau. Cette communication peut se faire via la production de molécules neuro-actives et neuroendocrines tels que la sérotonine, le GABA, l'histamine, la noradrénaline et l'adrénaline (Bienenstock and Collins, 2010; Forsythe et al., 2010). Une étude métabolomique utilisant des souris axéniques a montré que les taux de sérotonine sérique sont 2,8 fois plus élevés chez les souris conventionnelles que chez les souris axéniques, bien que des preuves directes n'aient pas démontré la production de sérotonine par les bactéries entériques (Wikoff et al., 2009). Certains microorganismes intestinaux tels que les lactobacilles peuvent convertir le glutamate en GABA (Li and Cao, 2010; Su et al., 2011), qui fonctionne comme un neurotransmetteur modulant le système nerveux central et pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la douleur. L'administration de *L. rhamnosus* JB-1 à des souris a entraîné une modification du profil des récepteurs GABA



dans le cerveau, une réduction de la corticostérone induite par le stress et une diminution du comportement lié à l'anxiété et à la dépression, tous absents chez les animaux vagotomisés (Bravo et al., 2011). L'effet inhibiteur des bactéries intestinales sur la douleur viscérale provenant du tractus gastro-intestinal a été démontré dans un modèle de distension colorectale chez des rats Sprague-Dawley. Le traitement avec *L. rhamnosus* ATCC 23272 pendant 9 jours consécutifs a entraîné l'inhibition de la perception de la douleur chez les animaux lorsque la distension du côlon était appliquée (Kamiya et al., 2006).

#### **4.5. Les probiotiques dans le contexte des MICI**

La plupart des approches thérapeutiques classiques actuelles pour la prise en charge de MICI ont leurs limites, notamment pour la prise en charge de la MC et présentent de nombreux effets secondaires. Les MICI sont clairement reconnus comme des maladies multifactorielles. La restauration de l'homéostasie du microbiote intestinal, le renforcement des fonctions intestinales, la modulation des réponses immunitaires ainsi que la réactivation des processus autophagiques constituent des nouvelles cibles thérapeutiques et/ou préventives pour lutter contre les complications des MICI (Lichtenstein et al., 2016; Sales-Campos et al., 2015).

De ce fait, l'utilisation de probiotiques comme outils thérapeutiques a reçu beaucoup d'attention cette dernière décennie en raison de l'aspect «naturel» et non-néfaste d'un tel traitement. En effet, ces micro-organismes sont reconnus pour leurs capacités protectrices par le biais de nombreux mécanismes différents, correspondant à des fonctions qui sont connues pour être déficientes chez les patients atteints de MICI. Cela inclut (i) la production de composés antimicrobiens, (ii) l'adhésion accrue à la muqueuse intestinale et l'exclusion compétitive des microorganismes pathogènes, (iii) la restauration et la maintenance de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal et (iv) la modulation du système immunitaire incluant des propriétés anti-inflammatoires bien documentées (Hold et al., 2014; Sartor, 2005; Scaldaferri et al., 2013). Néanmoins, les probiotiques ne persistent pas, ce qui vient d'être confirmé par des études poussées (Zmora et al., 2018). Leur administration doit donc être poursuivie de façon régulière et quotidienne pour conduire à des effets bénéfiques sur la santé. Néanmoins leur efficacité a été démontrée dans la prise en charge des patients atteints de RCH mais reste limitée pour celle des patients souffrant de MC (Ghouri et al., 2014).

#### 4.5.1. Etudes *in vitro*

Afin d'une part de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les capacités protectrices des probiotiques et d'autre part de définir des modèles et critères permettant une sélection optimale et scientifique des souches, de nombreux modèles *in vitro* ont été développés.

##### ***Amélioration de la barrière épithéliale***

Les MICI sont associées à des perturbations de la barrière intestinale, notamment liée à une perturbation des protéines de jonctions serrées, conduisant à une hyperperméabilité intestinale, également connue sous le nom de «leaky gut». Suite à cette perturbation, divers molécules indésirables, telles que des toxines ou des bactéries néfastes, peuvent traverser la barrière intestinale, activant des réponses immunitaires pro-inflammatoires, conduisant à une dysrégulation des réponses immunitaires muqueuses et au développement d'inflammations chroniques (Natividad and Verdu, 2013). Des études récentes ont montré que les probiotiques peuvent améliorer (ou restaurer) la perméabilité intestinale via 3 mécanismes: (i) protection des entérocytes contre l'apoptose (Yan and Polk, 2002), (ii) stimulation de la synthèse des protéines qui sont des composants essentiels des jonctions serrées, ainsi que la réduction de la perméabilité paracellulaire (Ahrne and Hagslatt, 2011; Lomasney et al., 2014; Souza et al., 2016) et (iii) l'augmentation de la production des mucines (Mack et al., 2003).

Plusieurs études ont indiqué que l'amélioration de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation des jonctions serrées est un mécanisme possible pour renforcer l'intégrité de la barrière intestinale. Par exemple, des lactobacilles peuvent moduler la régulation de plusieurs gènes codant pour des protéines des jonctions serrées, telles que l'E-cadhérine *in vitro*. De plus, l'incubation de cellules intestinales avec des souches de lactobacilles influence différemment la phosphorylation des protéines de jonctions serrées (Hummel et al., 2012). L'augmentation de l'expression des gènes des jonctions tels que les occludines, ZO-1 et ZO-2 a été confirmée par la capacité à renforcer la barrière épithéliale par la souche *L. plantarum* MB452 (Anderson et al., 2010).

Des études ont indiqué que les probiotiques peuvent initier la réparation de la fonction barrière endommagée. Par exemple, la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 empêche non seulement la rupture de la barrière muqueuse induite par un *E. coli* entéropathogène, mais elle rétablit même l'intégrité de la muqueuse dans les cellules T84 et Caco-2. Cet effet est lié à l'augmentation de l'expression et la redistribution accrues des protéines de jonctions serrées comme ZO-2 et les protéines kinase C, ce qui conduit à la reconstruction du

complexe de jonctions serrées (Stetinova et al., 2010; Zyrek et al., 2007). De même, *L. casei* DN-114001 (Parassol et al., 2005) et le mélange VSL#3 (Otte and Podolsky, 2004) sont capables de maintenir la fonction de la barrière intestinale par des mécanismes similaires. Un article récent a rapporté que VSL#3 protège la barrière épithéliale et augmente l'expression de protéines de jonctions serrées *in vivo* et *in vitro* en activant les voies de signalisation p38 (Dai et al., 2012). Des études récentes ont montré la capacité des souches probiotiques à restaurer la monocouche de cellules épithéliales (Caco-2) sensibilisées par du peroxyde d'hydrogène (Alard et al., 2018; Seth et al., 2008), proposant ce modèle comme modèle de criblage de souches capables de restaurer la fonction barrière.

L'épithélium du tractus gastro-intestinal est revêtu d'une couche protectrice de mucus. Cette barrière de mucus, produite par les cellules caliciformes intestinales, contribue à améliorer la fonction de barrière et à l'exclusion des micro-organismes et autres substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale. La diminution de la sécrétion des mucines conduit à la diminution de la distance entre les microorganismes et la muqueuse intestinale ce qui provoque des réactions inflammatoires allant d'une inflammation de bas grade jusqu'aux différents types d'inflammation chronique. Certaines souches probiotiques ont montré la capacité de stimuler la sécrétion de mucine. Par exemple, *L. plantarum* 299v et *L. rhamnosus* GG augmentent l'expression génique de mucine dans les lignées cellulaires intestinales humaines et bloquent l'adhérence et l'invasion de *E. coli* entéropathogène O157:H7 aux cellules épithéliales intestinales, prévenant ainsi la translocation bactérienne pathogène (Mack et al., 2003; Mattar et al., 2002).

### ***La modulation du système immunitaire : les immunobiotiques***

#### ***Etude de l'immunomodulation***

La co-culture de souches potentiellement probiotiques avec des cellules immunes, notamment des cellules mononucléées de sang humain (PBMC) permet d'évaluer les profils immuno-modulateurs des souches. Il est ainsi possible de sélectionner des souches à profil anti-inflammatoire (forte capacité à induire de l'IL-10) ou pro-Th1 (forte capacité à induire de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-12) (Foligné et al., 2007a).

Il est également possible d'évaluer les capacités anti-inflammatoires des souches à l'aide de cellules épithéliales. Ko *et al.* 2007 ont montré que l'interaction des cellules Caco-2 avec *L. plantarum* ATCC 8014 et *L. rhamnosus* LGG peut diminuer la sécrétion d'IL-8 induites par du TNF- $\alpha$ , en bloquant la translocation de NF- $\kappa$ B (Ko et al., 2007; Zhang et al., 2005). De même, la pré-incubation *in vitro* de la lignée cellulaire épithéliale HT-29 avec *B. infantis* et *L. salivarius* était capable de réduire la réponse pro-inflammatoire induite par *S. typhimurium*

(O'Hara et al., 2006) et aussi d'inhiber la production d'IL-8 après stimulation des cellules HT-29 par IL-1 $\beta$  (Kechaou et al., 2013). De même, *L. plantarum* CGMCC1258 réduit l'expression des gènes qui codent pour l'IL-8 et du TNF- $\alpha$  dans les cellules épithéliales intestinales déjà stimulée par *E. coli* K88 (Wu et al., 2016).

#### 4.5.2. Modèles expérimentaux

Les capacités protectrices et notamment anti-inflammatoires des probiotiques ont été démontrés dans divers modèles expérimentaux *in vivo*, soit de colite spontanée, de colite induites par des agents chimiques (TNBS ou DSS) ou par le transfert de cellules (Tableau 4).

##### ***Inflammation induite par le Dextran Sulfate Sodium (DSS)***

Une colite expérimentale peut être induite par l'administration orale de DSS dans l'eau de boisson, conduisant principalement à une désorganisation de la surface épithéliale de l'intestin (Randhawa 2014). Ce modèle est intéressant pour évaluer l'impact des probiotiques sur la barrière et la restauration de la perméabilité intestinale (Martín et al., 2017).

Les effets protecteurs de *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. animalis* subsp. *lactis* et *B. breve* (Ultrabiotique®) ont été évalués dans ce modèle de colite au DSS. L'administration orale des souches probiotiques a réduit la gravité de la colite induite ainsi que des taux de NO (Abdelouhab et al., 2012). Le même mélange de souches a été testé dans une autre étude pendant sept jours. L'administration de ces probiotiques a amélioré les symptômes cliniques et les altérations histologiques observées dans le groupe colite. De plus, le groupe de souris traitées par ce mélange a montré une réduction de la production de NO ainsi qu'une augmentation de la production de mucus (Toumi et al., 2013).

D'autres études ont montré que la sévérité de la colite induite par le DSS a été significativement réduite par l'administration de la souche *L. reuteri* R2LC et de *B. longum* subsp. *longum* CCM 7952 (Ahl et al., 2016; Srutkova et al., 2015a). Les marqueurs d'inflammation MPO, IL-1 $\beta$  et IL-6 augmentés par l'administration du DSS, ont été significativement réduits par le traitement probiotique. L'épaisseur de mucus réduite par le DSS, a été significativement augmentée par la souche *L. reuteri* R2LC.

De même, l'expression des protéines de jonctions serrées tel que l'occludine et le ZO-1 a été significativement augmentée chez les souris ayant reçu ces probiotiques (Ahl et al., 2016; Srutkova et al., 2015a). L'administration de *B. longum* CCM 7952 a amélioré la fonction de la barrière intestinale, démontrée par la diminution du passage de FITC-dextran dans le sang (Srutkova et al., 2015a). La thérapie probiotique a ainsi protégé la barrière épithéliale dans ce modèle de colite aiguë en prévenant i) une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées et ii) une augmentation du ratio apoptotique (Mennigen et al., 2009).

**Tableau 4: Etudes expérimentales ayant évalué les effets de souches potentiellement probiotiques en modèles de colite.**

<b>Souche probiotique</b>	<b>Modèle de colite</b>	<b>Animaux</b>	<b>Résultats</b>	<b>Effets observés</b>	<b>Référence</b>
<i>B. bifidum</i> 231	TNBS	Rats	Bénéfique	Diminution de niveaux de NO	(Satish Kumar et al., 2017)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> S17	TNBS	Souris C57/BL6	Bénéfique	ND	(Preising et al., 2010)
<i>Bifidobacterium infantis</i>	TNBS	Souris BALB/c	Bénéfique	Diminue les réponses Th1 et Th17 et augmente la réponse Treg Foxp3 (+) dans la muqueuse colique	(Zuo et al., 2014)
<i>Bifidobacterium lactis</i> LA 303, <i>Lb. acidophilus</i> LA 201, <i>Lb. plantarum</i> LA 301 and <i>salivarius</i> LA 302	TNBS	BALB/c	Bénéfique	ND	(Drouault-Holowacz et al., 2006)
<i>Bifidobacterium longum</i> HY8004	TNBS	Souris C3H/HeN et C3H/HeJ	Bénéfique	Inhibe la peroxydation lipidique, l'expression de TLR-4 et l'activation de NF-κB dans le côlon	(Lee et al., 2009)
<i>Escherichia coli</i> strain Nissle 1917	TNBS	Rats	Bénéfique	Augmente l'expression de ZO-1	(Sha et al., 2014)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	TNBS	Souris C57/BL6		ND	(Foligné et al., 2007a)
<i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179	TNBS	Souris BALB/c	Bénéfique	Augmente l'IL-10 colique	(Zoumpopoulou et al., 2008)
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT5716	TNBS	Souris BALB/c	Bénéfique	Diminue la production d'IL-6 et augmente MyD88	(Mañé et al., 2009)
<i>Lactobacillus helveticus</i> NS8	TNBS	Souris BALB/c	Bénéfique	ND	(Rong et al., 2015)
<i>Lactobacillus plantarum</i> TN8	TNBS	Rats Wistar	Bénéfique	Diminution des niveaux de NO	(Satish Kumar et al., 2017)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lcr35	TNBS	Rats Sprague-	Bénéfique	Régule l'activation	(Darbaký et al., 2017)

		Dawley		immunitaire locale de l'IL-23 / Th17	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR32	TNBS	Souris BALB/c; C57/BL6	Bénéfique	ND	(Foligné et al., 2007a)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> RC007	TNBS	Souris BALB/c	Bénéfique	Augmente l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux	(Dogi et al., 2016)
<i>Lactobacillus sakei</i> K17	TNBS	Souris C57/BL6	Bénéfique	Augmente l'expression de l'IL-10 et des protéines de jonction serrées et inhibe l'activation de NF-κB	(Eun et al., 2016)
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSS	Souris C57BL/6J	Bénéfique	Augmente les cellules T régulatrices dans les nœuds lymphoïdes mésentériques	(Hidalgo-Cantabrana et al., 2016)
<i>Bifidobacterium breve</i> M-16V	DSS	Rats	Bénéfique	ND	(Izumi et al., 2015)
<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i> CCDM 372	DSS	Souris C57BL/6		ND	(Srutkova et al., 2015a)
<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i> CCM 7952	DSS	Souris C57BL/6	Bénéfique	Améliore la fonction de barrière intestinale	(Srutkova et al., 2015a)
<i>Escherichia coli</i> strain Nissle 1917	DSS	Souris BALB/c	Bénéfique	Augmente le nombre de cellules T régulatrices dans les plaques de Peyer	(Souza et al., 2016)
<i>Lactobacillus brevis</i> KY21	DSS	BALB/c	Bénéfique	ND	(Kim et al., 2015)
<i>Lactobacillus plantarum</i> LS/07	DSS	Rats Sprague-Dawley	Bénéfique	Diminue l'activité β-glucuronidase	(Hijová et al., 2015)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (R0011)	DSS	Souris C57BL/6	Bénéfique	ND	(Emge et al., 2016)

Une autre étude a montré que l'administration de la souche *B. breve* a augmenté l'expression de l'ARNm codant pour les cytokines de type Th2 et associées aux Treg dans le côlon distal. De plus, l'intervention avec *B. breve* a entraîné des augmentations de Treg et une diminution des sous-populations de cellules Th17 dans les plaques de Peyer de souris traitées au DSS (Zheng et al., 2014).

Hong *et al.* ont évalué un mélange de *L. brevis* HY7401, *Lactobacillus* sp. HY7801, et *B. longum* subsp. *longum* HY8004 dans un modèle de colite aiguë induite par le DSS pendant sept jours (Hong et al., 2010). Des taux accrus d'acétate, de butyrate et de glutamine, en plus de taux réduits de triméthylamine, ont été notés dans les fèces du groupe probiotique par rapport aux souris traitées au DSS seul. L'augmentation des taux d'acides gras à chaîne courte dans les fèces des souris traitées par le mélange indique que les probiotiques ont des effets protecteurs contre la colite induite par le DSS via la modulation du microbiote intestinal.

#### **Inflammation induite par le 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)**

De nombreuses souches potentiellement probiotiques ont été évaluées à l'aide du modèle de colite aiguë induite par l'administration intra-rectale de TNBS (Martín et al., 2017).

L'impact de *L. plantarum* 21 sur les médiateurs inflammatoires de la colite induite par le TNBS a été étudié chez le rat. Le traitement avec *L. plantarum* 21 pendant 14 jours après l'induction de la colite a diminué le NO, et a augmenté les concentrations de glutathion. De plus, les taux d'IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  ont été diminués, tandis que l'expression de l'IL-10 a été augmentée chez les rats traités par *L. plantarum* 21. De plus, le traitement par probiotique a atténué les lésions macroscopiques du côlon et les modifications histopathologiques induites par le TNBS (Satish Kumar et al., 2015).

Les effets de l'administration de lactobacilles et de bifidobactéries sur l'expression du TNF- $\alpha$  et TLR4 dans un modèle de colite induite par le TNBS chez le rat ont également été étudiés. Aucune différence significative n'a été trouvée dans l'expression du TLR4 et TNF- $\alpha$  entre le groupe traité pendant deux semaines et le groupe contrôle, alors que des réductions significatives ont été trouvées chez les rats traités avec des probiotiques pendant quatre semaines par rapport au groupe TNBS (Yang et al., 2013).

Zuo *et al.* ont étudié l'effet de *B. infantis* sur les sous-populations de cellules T et sur la sévérité de la colite expérimentale, induite par l'administration de TNBS chez la souris. Des souris BALB/c ont reçu différentes doses de *B. infantis* pendant 3 semaines, et les sous-populations de lymphocytes T et les profils de cytokines associés ont été suivis dans les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN). Les profils des cytokines dans les MLN et les

modifications histologiques du tissu colique ont été examinés 6 jours après l'induction de la colite (Zuo et al., 2014). Cependant, les cytokines de type Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12p40), le facteur de transcription et les cytokines associées à une réponse Th17 (ROR $\gamma$ t, IL-21, IL-23 ou Treg (Foxp3, IL-10) ont été augmentés chez les souris saines après l'administration de *B. infantis*. En outre, *B. infantis* a augmenté le nombre de Tregs CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> et de cellules Th17 dans les MLN. D'autre part l'administration de *B. infantis* a diminué l'infiltration cellulaire inflammatoire et la déplétion des cellules caliciformes et a restauré l'épithélium intestinal après l'induction de colite. De plus, elle a réduit les cytokines liées à des cellules Th1 (T-bet, IL-2 et IFN- $\gamma$ ) et les cytokines liées à des cellules Th17 (IL-12p40, ROR $\gamma$ t, IL-17A, IL-21 et IL-23). D'autre part, *B. infantis* a augmenté des molécules apparentées aux Treg (Foxp3, IL-10 et TGF- $\beta$ ) (Zuo et al., 2014).

*B. bifidum* 231 a également été évalué dans un modèle de colite induite par l'injection intrarrectale de TNBS. Le traitement du *B. bifidum* 231 a révélé des effets anti-inflammatoires après analyses macroscopiques et histologiques et a abaissé les niveaux de NO. *B. bifidum* 231 a entraîné une diminution de l'IL-1 $\beta$  et une augmentation des niveaux d'IL-10 (Satish Kumar et al., 2015). D'autres études, incluant celles de mon équipe d'accueil ont montré les effets souche-spécifiques de différents lactobacilles et bifidobactéries et ont mis en évidence une bonne corrélation entre leurs effets protecteurs *in vivo* et leurs capacités *in vitro* à induire un profil de cytokines anti-inflammatoires (forte induction d'IL-10 et faible induction d'IL-12 et IFN- $\gamma$ ) (Alard et al., 2018; Foligné et al., 2007a). À l'inverse les souches présentant un faible profil anti-inflammatoire *in vitro* n'étaient pas capables de protéger les souris de la colite (Foligné et al., 2007a), ce qui a pu être relié à la structure et/ou au turnover de leur paroi (Grangette et al., 2005; Macho Fernandez et al., 2011)

### ***Dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS)***

Martin *et al.* ont évalué les effets sur la fonction de barrière intestinale de *B. animalis* subsp. *lactis* CNCM I2494 dans un modèle d'inflammation chronique de bas grade induite par l'administration du DNBS causant un dysfonctionnement intestinal chez la souris. Dans ce modèle, plusieurs paramètres ont souligné l'absence d'un processus d'inflammation actif, mais une altération de la fonction barrière, de la réponse lymphocytaire et des profils cytokiniques (Martín et al., 2016). L'administration de la souche *B. animalis* subsp. *lactis* CNCM-I2494 a permis de rétablir ces dysfonctions, limitant la perméabilité intestinale, la population de cellules caliciformes du côlon et les taux de cytokines et protéines de jonction serrées, en particulier la Claudine 4. Enfin, la souche de *B. animalis* subsp. *lactis* a contrebalancé les altérations lymphocytaires CD4<sup>+</sup> au niveau de la rate et des lymphoïdes mésentériques, en restaurant l'équilibre Th1 / Th2 altéré par le traitement DNBS.



### **Modèle lié à des infections pathogènes**

Des infections notamment par des pathogènes entériques conduisent à des réponses inflammatoires et des désordres intestinaux, ce qui est le cas de certains *E. coli* enteropathogènes (EPEC) ou entéroinvasifs (AIEC). Ces derniers sont notamment fréquemment retrouvés chez les patients souffrant de MC (Darfeuille-Michaud et al., 2004). Chez la souris, des modèles d'infection par *Citrobacter rodentium* mimant ce type d'infection ont permis de montrer des effets bénéfiques de *S. cerevisiae* var. *bouardii* (Wu et al., 2008), ainsi que certains lactobacilles dont LGG (Mackos et al., 2016; Ryu et al., 2016).

### **Colites spontanées**

Des souris déficientes pour l'IL-10 peuvent développer des colites spontanées (Kühn et al., 1993), cependant l'induction est variable selon les laboratoires. Le mélange VSL#3 a ainsi montré des effets protecteurs en améliorant la fonction barrière (Madsen et al., 2001), ainsi qu'un autre mélange contenant *B. longum* subsp. *longum*, *L. acidophilus* et *E. faecalis* (Shi et al., 2014). Les effets protecteurs de *L. plantarum* 299v (Schultz et al., 2002) et de *L. salivarius* UCC118 et *B. infantis* 35 (McCarthy et al., 2003) ont également été rapportés.

### **Transfert adoptif de cellules**

L'un des modèles de colite les plus pertinents permettant de reproduire les symptômes observés au cours des MICI, est obtenu par transfert de cellules T CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> de souris donneuses sauvages à des souris receveuses déficientes en cellules T et B (souris SCID ou Rag<sup>-/-</sup>). Ce modèle conduit à une inflammation transmurale, une érosion épithéliale et une infiltration de cellules inflammatoires (Powrie et al., 1994) et a permis notamment de montrer le rôle clé des cellules T régulatrices. Il a été utilisé pour évaluer l'effet bénéfique de lactobacilles génétiquement modifiés (Motta et al., 2012) et du cocktail VSL#3 (Di Giacinto et al., 2005), montrant que le transfert de cellules de *lamina propria* permet de reproduire les effets protecteurs, liés notamment à l'induction de Treg.

## **4.5.3. Étude clinique chez l'homme**

De nombreuses études ont évalué l'effet de probiotiques chez des patients atteints de MICI. Différentes souches probiotiques ont montré des résultats variables en ce qui concerne la réponse clinique par rapport à un placebo ou un traitement standard.

Une méta-analyse regroupant 21 études a évalué l'utilisation des probiotiques, prébiotiques et / ou symbiotiques comme traitement d'induction ou traitement de maintenance de la rémission chez les patients atteints de RCH (Ghouri et al., 2014). La majorité des souches probiotiques testées ont montré des effets bénéfiques soit en diminuant le taux de rechute ou bien en diminuant les manifestations cliniques de la

maladie. La majorité des études dans le contexte de la RCH a été réalisée à l'aide du mélange VSL#3, contenant 8 souches différentes : *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. infantis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (Miele et al., 2009; Sood et al., 2009; Tursi et al., 2010, 2004).

Une étude réalisée par Kruis *et al.* utilisant la souche *E. coli* Nissle 1917 en comparaison avec de la mésalamine a montré les mêmes effets pour le groupe probiotique par rapport au groupe mésalamine (Kruis et al., 2004). Il n'y avait pas de différences statistiquement significatives dans le score de qualité de vie, les scores d'endoscopie, et les scores histologiques (Kruis et al., 2004).

En 2010, Hegazy et El-Bedewy ont utilisé une préparation probiotique contenant des souches de *L. delbrueckii* et *L. fermentum* pendant 8 semaines. L'amélioration histologique de l'inflammation était significativement dans le groupe probiotique associée à une diminution de la calprotectine fécale et des cytokines inflammatoires au niveau de la muqueuse (Hegazy and El-Bedewy, 2010).

En 2012, Oliva *et al.* ont réalisé une étude dans une population pédiatrique présentant une RCH en rémission, avec la souche *L. reuteri* ATCC 55730 associée à de la mésalamine. Les résultats de l'étude ont montré une amélioration des scores cliniques et endoscopiques et une diminution de la gravité des marqueurs inflammatoires dans le groupe probiotique (Oliva et al., 2012).

En ce qui concerne la maladie de Crohn, une méta-analyse systématique des études cliniques réalisées chez l'homme avec des prébiotiques, probiotiques ou symbiotiques a été aussi publiée, analysant les données de 14 études différentes (Tableau 5) (Ghouri et al., 2014). Cinq études cliniques ont été réalisées en utilisant des lactobacilles. Aucun effet protecteur ou bénéfique permettant la rémission ou la prévention des rechutes cliniques ou endoscopiques n'a été mis en évidence en utilisant les souches *L. johnsonii* NCC533 et *L. rhamnosus* GG (Bousvaros et al., 2005; Marteau et al., 2006; Plein and Hotz, 1993; Prantera et al., 2002; Schultz et al., 2004; Van Gossum et al., 2007). Fait intéressant, deux études ont montré un certain bénéfice clinique après l'administration de la levure *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Guslandi et al., 2000; Plein and Hotz, 1993). En 2013, Bourreille *et al.* ont réalisé une étude évaluant l'administration de la levure *S. cerevisiae* var. *boulardii* mais aucun effet bénéfique a été observé ni sur la diminution du risque de rechute ni sur l'amélioration des manifestations cliniques de la maladie (Bourreille et al., 2013). L'administration de la souche *E. coli* Nissle 1917 a conduit par contre à des effets bénéfiques montrant une diminution des rechutes chez des patients allemands souffrant de MC (Malchow, 1997).

**Tableau 5 : Etudes cliniques ayant évalué l'impact de probiotiques chez des patients atteints de MC.**

<b>Souche probiotique</b>	<b>Nombre de Sujets</b>	<b>Point final primaire</b>	<b>Avantage statistique</b>	<b>Référence</b>
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	17	Rémission clinique	Oui	(Plein and Hotz, 1993)
<i>E. coli</i> strain Nissle 1917	28	Taux de rechute clinique	Non	(Malchow, 1997)
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	32	Taux de rechute clinique	Oui	(Guslandi et al., 2000)
LGG	45	Taux de récurrence endoscopique	Non	(Prantera et al., 2002)
LGG	11	Temps moyen de rechute clinique	Non	(Schultz et al., 2004)
LGG	75	Taux de rechute clinique	Non	(Bousvaros et al., 2005)
<i>L. johnsonii</i>	98	Taux de récurrence endoscopique	Non	(Marteau et al., 2006)
<i>L. johnsonii</i>	70	Taux de récurrence endoscopique	Non	(Van Gossum et al., 2007)
Synbiotic 2000	30	Paramètres endoscopiques, cliniques et de laboratoire	Non	(Chermesh et al., 2007)
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	31	Perméabilité intestinale	Oui	(Garcia Vilela et al., 2008)
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> and Synergy 1	24	Réponse clinique	Oui	(Steed et al., 2010)
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	165	Taux de rechute clinique	Non	(Bourreille et al., 2013)

# ***OBJECTIFS***

Les Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale et une perte de l'intégrité de la barrière intestinale. Ces pathologies sont également associées à des dysbioses du microbiote. Les probiotiques de ce fait ont été proposés comme une alternative thérapeutique intéressante, cependant leurs effets sont souche-spécifiques et restent peu efficaces dans le traitement de la maladie de Crohn (MC). Il est donc important d'avoir au préalable une sélection basée sur des critères scientifiques associés à la pathologie.

**Notre premier objectif** a donc consisté à cribler *in vitro* une collection de souches pour leurs capacités anti-inflammatoires et leurs capacités à restaurer la barrière épithéliale. Nous avons ensuite évalué *in vivo*, dans deux modèles de colite aigüe et de bas grade chez la souris, leurs capacités protectrices. Cette étude nous a permis de sélectionner des souches prometteuses présentant des propriétés anti-inflammatoires et/ou des capacités à limiter la perméabilité intestinale.

De nombreux polymorphismes génétiques sont retrouvés chez les patients atteints de MICI. Des mutations dans les gènes impliqués dans la cascade autophagique ont notamment été mises en évidence, en particulier chez les patients atteints de maladie de Crohn (MC). De nombreuses études ont confirmé que l'autophagie joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale et semble être impliquée dans le contrôle du microbiote et la régulation des réponses inflammatoires. Peu de travaux ont cependant étudié son rôle dans l'interaction de bactéries probiotiques et/ou commensales avec l'hôte.

**Notre deuxième objectif** a été de ce fait d'évaluer dans un premier temps la capacité des souches préalablement sélectionnées à activer l'autophagie puis dans un deuxième temps de déterminer *in vitro* et *in vivo* le rôle de ce processus dans les capacités immuno-régulatrices des souches.

# ***MATERIELS ET METHODES***

## Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches utilisées au cours de ce travail sont listées dans le Tableau 6, comprenant 6 bifidobactéries (dont 3 provenant de la collection libanaise CMUL), 6 lactobacilles (dont 2 provenant de la collection libanaise CMUL) et la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917. Les bifidobactéries ont été cultivées une nuit à 37 °C, en milieu MRS (De Man Rogosa Sharpe, Difco) additionné de cystéine (Sigma, USA) à 500 µg/ml en condition anaérobie (GENbaganaer, Biomérieux, France) et les lactobacilles en milieu MRS à 37 °C en condition micro-aérophiles. La souche d'*E. coli* Nissle 1917 a été cultivée à 37 °C en milieu LB (Luria-Bertani, Difco) sous agitation. Pour les études *in vitro*, les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase stationnaire (18 h). Elles ont ensuite été lavées deux fois en PBS stérile (Phosphate Buffered Saline; pH 7,2), et remises en suspension à 10<sup>9</sup> CFU/ml (Colony Forming Unit) ou en unité Mac Farland (McF) de 3, dans une solution de PBS contenant 20% de glycérol (v/v) pour les stimulations *in vitro*. Les suspensions ont été aliquotées et conservées à -80 °C. Pour les études *in vivo*, les bactéries fraîchement cultivées ont été ajustées à 5 x 10<sup>9</sup> CFU / ml dans un tampon gavage (NaHCO<sub>3</sub> 200 mM contenant 1% de glucose). Deux souches bactériennes commerciales, *L. acidophilus* NCFM, fournies par la Société DuPont™ Danisco (Madison, WI, USA) et *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 fournie par G. Vinderola (INLAIN, UNL-CONICET, Argentine) ont été utilisées comme souches de référence pour les tests de stimulation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) comme décrit précédemment (Burns et al., 2017; Foligné et al., 2007a).

**Tableau 6 : Liste des bactéries étudiées.**

Espèce	Souche	Source d'isolement
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	IPL A7.31	Selles d'enfant
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>Infantis</i>	IPL A7.32	Selles d'enfant
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>Longum</i>	IPL A7.33	Selles d'enfant
<i>Bifidobacterium longum</i> .	CMUL CLX 001	Prélèvement aginal
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CMUL CLX 002	Selles d'enfant
<i>Bifidobacterium longum</i>	CMUL CLX 003	Selles d'enfant
<i>Lactobacillus gasseri</i>	IPL A6.62	Prélèvement vaginal
<i>Lactobacillus gasseri</i>	IPL A6.33	Prélèvement vaginal
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	IPL A2.21	Prélèvement vaginal
<i>Lactobacillus gasseri</i>	CMUL 057	Prélèvement vaginal
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ``	CMUL 067	Prélèvement vaginal
<i>Lactobacillus reuteri</i>	100-23	Intestin de rongeur
<i>E. coli</i>	Nissle 1917	Selles d'adulte

## **Stimulation de cellules mononuclées (CMN) de sang humain**

Afin d'évaluer les capacités immuno-modulatrices des bactéries et comparer leur capacité à induire différents profils de cytokines, des cellules mononuclées humaines ont été isolées à partir du sang périphérique de cinq donneurs sains informés par un accord approuvé (consentements signés), par du personnel autorisé, comme décrit précédemment (Foligné et al., 2007a; Grangette et al., 2005). Brièvement, le sang a été déposé sur un gradient de Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Suède), et après centrifugation, les CMNs ont été récupérées à l'interface, lavées avec PBS et ajustées à  $2 \times 10^6$  cellules / ml dans du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco), supplémenté de 1mM de glutamine (Gibco, Ecosse), 50 µg/ml de gentamycine (Gibco, Ecosse) et 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Ecosse) décomplémenté et mises en culture dans des plaques 24 puits. Elles ont été stimulées par les bactéries, à un ratio bactéries /cellules de 10:1 (20 µl d'une suspension bactérienne décongelée à  $10^9$  CFU/ml dans chaque puits). Du PBS contenant 20% de glycérol a été utilisé comme control négatif (témoin non-stimulé). Après 24 h de stimulation à 37 °C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les surnageants ont été collectés, clarifiés par centrifugation et conservés à -20 °C jusqu'au dosage des cytokines. Les cytokines Interleukine 10 (IL-10, cytokine anti-inflammatoire), l'Interféron gamma (INF-γ) et l'IL-12 (cytokines pro-Th1) ont été dosées dans les surnageants par ELISA à l'aide de kits Duoset (R&D System), selon les indications du fabricant.

Afin d'évaluer le rôle de l'autophagie dans les capacités anti-inflammatoires des probiotiques, des cellules mononuclées isolées de sang humain ( $1 \times 10^6$  cellules/ml dans des plaques à 48 puits) ont été pré-traitées pendant 1 heure à 37 °C en présence ou non de 3-méthyladenine (3-MA, 5 mM) ou de bafilomycine (5 nM), puis stimulées par les bactéries, à un ratio bactéries/ cellules de 10:1 ou de PBS contenant 20% de glycérol comme témoin négatif. Après 24 h de stimulation à 37 °C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les surnageants ont été collectés, clarifiés par centrifugation et conservés à -20 °C jusqu'au dosage des cytokines IL-10 et IL-1β par ELISA à l'aide de kits Duoset (R&D System), selon les indications du fabricant.

## **Stimulation de la lignée de cellules épithéliales humaines HT-29**

L'étude des propriétés immuno-modulatrices des souches a été poursuivie par l'évaluation de la capacité des souches à moduler la production de la chimiokine Interleukine-8 (IL-8) par la lignée épithéliale HT-29 stimulée par de l'IL-1β. Les cellules ont été cultivées en plaques de 24 puits à raison de  $5 \times 10^4$  cellules dans 1 ml de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Ecosse) additionné de 1mM de glutamine (Gibco), 50µg/ml de gentamycine (Gibco), 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Ecosse) décomplémenté et 1%



d'acides aminés non essentiels (AANE 100 X, Gibco) à 37 °C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé tous les jours. Après 5 jours de différenciation, les cellules ont été ensuite stimulées (ou non) par les bactéries à un rapport bactéries / cellules de 10 :1 (correspondant au nombre de cellules après expansion), 1 h avant l'addition d'IL-1 $\beta$  (2.5 ng/ml, Peprotech, USA) puis la stimulation a été poursuivie pendant 6h. Après co-incubation, les surnageants ont été collectés, clarifiés par centrifugation et conservés à -20 °C jusqu'au dosage de l'IL-8 par ELISA à l'aide de kit Human IL-8 ELISA MAX™ Deluxe (BioLegend System), selon les indications du fabricant.

### **Stimulation de la lignée de cellules monocytaires humaines THP-1**

L'étude des propriétés immuno-modulatrices des souches a été également évaluée par l'évaluation de leur capacité à moduler la production de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  produit après stimulation *in vitro* de macrophages dérivés de la lignée monocyttaire humaine THP-1 stimulés par du LPS. Les cellules THP-1 ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, Ecosse) supplémenté de 1mM de glutamine (Gibco), 50 $\mu$ g/ml de gentamycine (Gibco), 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Ecosse) décomplémenté et 50 $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Gibco) à 37 °C sous 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules ont été cultivées en plaques de 6 puits à raison de 1 x 10<sup>6</sup> cellules dans 3 ml de milieu complet. La différenciation en macrophages a été réalisée par stimulation des cellules THP-1 par 100 ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) pendant 72 h. Après la différenciation, les cellules ont été stimulées (ou non) par les bactéries à un rapport bactéries / cellules de 10:1, 12 h avant l'addition de LPS (10 ng/ml, Sigma, USA) puis la stimulation a été poursuivie pendant 6h. Après co-incubation, les surnageant ont été collectés, clarifiés par centrifugation et conservés à -20 °C jusqu'au dosage de TNF- $\alpha$  par ELISA à l'aide d'un kit Duoset (R&D System), selon les indications du fabricant.

### **Modèle *in vitro* de barrière intestinale**

Afin d'évaluer la capacité des bactéries à restaurer la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, nous avons utilisé un modèle de barrière *in vitro* basé sur l'obtention d'une monocouche étanche de cellules épithéliales de côlon humain à l'aide de la lignée humaine Caco-2 (clone TC7) cultivées sur un filtre de polycarbonate (transwell) puis sensibilisées par du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Alard et al., 2018).

Les cellules Caco-2 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Gibco) supplémenté par 1mM de glutamine (Gibco, Ecosse), 100 U / ml de pénicilline, 100 µg / ml de streptomycine (Gibco, Ecosse), 5% de sérum de veau fœtal (Gibco, Ecosse) décomplémenté et 1% d'acides aminés non essentiels (AANE 100 X, Gibco, Ecosse) à 37 °C sous 10% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont étéensemencées à raison de 1 x 10<sup>5</sup> cellules dans 1 ml de milieu de culture dans des inserts (membrane de polycarbonate de porosité 0,4µ, ou transwell, diamètres 12 mm, Costar, Corning Life Science, Kennebunk, USA) et ont été incubées à 37 °C sous 10% de CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé tous les deux jours pendant 14 jours, jusqu'à ce que la résistance électrique trans-épithéliale atteigne un plateau maximal (TEER ≥ 1800 Ω / cm<sup>2</sup>). La TEER a été mesurée tous les 2 jours à l'aide d'un voltmètre Millipore (Millicell MERS - Electrical Resistance System, Millipore, Billerica, USA). Après 14 jours de différenciation, les cellules Caco-2 ont été incubées pendant 30 min en DMEM seul (sans SVF) puis stimulées par les souches au pôle apical à un ratio bactéries / cellules de 10 :1 (correspondant au nombre de cellules après expansion sur le filtre), 30 min avant l'addition d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM final) au pôle basal et apical des transwell. La TEER a été mesurée toutes les 30 minutes après sensibilisation.

Les résultats ont été exprimés en % TEER par rapport à la TEER initiale mesurée à T0 (avant l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour chaque insert en utilisant la formule suivante : TEER (Ω.cm<sup>2</sup>) / TEER initiale (Ω.cm<sup>2</sup>) x 100 (%). D'autre part, la capacité des bactéries à dégrader l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été évaluée en mesurant la concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après co-incubation avec les bactéries pendant 120 min dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Le dosage d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été réalisé à l'aide du kit Hydrogen Peroxide Cell-Based Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Harbour, MI, USA), selon les indications du fabricant.

Le marquage de ZO-1 a été réalisé par immunofluorescence et microscopie confocale. Deux heures après l'addition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les monocouches cellulaires ont été fixées avec du Paraformaldéhyde à 4% en PBS 1X pendant 10 min, lavées par du PBS puis perméabilisées et saturées par du PBS contenant 0,1% (v / v) de Triton X-100, 3% (v / v) BSA pendant 30 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été marquées pendant 3 heures d'incubation à température ambiante par l'anticorps monoclonal ZO-1 conjugué à de l'Alexa Fluor 488 (ZO1-1A12, Invitrogen, Camarillo, USA) à 5 µg / ml dans 0,1% de BSA (serum albumine bovine). Les cellules ont ensuite été lavées par du PBS et les membranes ont été montées sur des lames de verre sur lesquelles ont été préalablement déposés 7 µl de Dako Fluorescence Mounting Medium (California, USA). La microscopie confocale a été réalisée en utilisant un microscope confocale à balayage laser (Zeiss, LSM 880).

## **Préparation de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris (BMDCs)**

Les cellules dendritiques (DCs) ont été différenciées à partir de cellules souches de moelle osseuse isolée du fémur et du tibia de souris femelles BALB/c ByJ âgées de 7 à 8 semaines, fournies par la Société Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France. Elles ont été préparées selon la technique décrite par Lutz *et al.* (Lutz et al., 1999) avec des modifications mineures. Brièvement, après lyse des globules rouges (tampon NH<sub>4</sub>Cl 0,162M; PBS 0,04X), les cellules ont été cultivées en boîtes de Pétri (non traitées culture cellulaire), à 2 x 10<sup>6</sup> cellules par boîte dans 10ml de milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco, Ecosse) supplémenté de 1mM de glutamine (Gibco, Ecosse), 50µg/ml de gentamycine (Gibco, Ecosse), 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Ecosse) décomplémenté, 50µM de β-mercaptoéthanol (Gibco, Ecosse) et de 10% de surnageant de culture de la lignée cellulaire J558 (lignée cellulaire transfectée par le gène codant pour le GM-CSF) produisant du GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor). Après trois jours de différenciation, du milieu complet frais a été ajouté. Au septième jour, les cellules surnageantes et adhérentes ont été récupérées, et après lavage en PBS (sans Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>), elles ont été remises en suspension et cultivées dans du nouveau milieu IMDM complet, en plaques 24 puits à 1 x 10<sup>6</sup> cellules/ml. Les cellules ont été utilisées à 10 ou 13 jours de différenciation.

## **Stimulation des BMDCs et suivi de l'activation autophagique**

Les cellules dendritiques ont été stimulées (ou non) à différents temps (2h ou 4h) par les bactéries, à un ratio bactéries/ cellules de 10:1 ou par de la rapamycine (Sigma, Saint-Louis, USA) inducteur de l'autophagie, cible de la protéine mTor (cible de la rapamycine), à 10µg/ml comme contrôle positif.

Deux marqueurs ont été sélectionnés pour suivre l'activation de l'autophagie :

- 1) La conversion de la protéine LC3I (Autophagy marker Light Chain 3) en LC3II (conjugué à la phosphatidyléthanolamine) a été suivie par électrophorèse en SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) et Western blot.
- 2) La formation des autophagosomes ayant incorporé la protéine LC3 a été évaluée par immunofluorescence et analysé par microscopie confocale (détection de puncta fluorescents).

#### - **SDS-PAGE et Western-Blot**

Les cellules stimulées (ou non) en plaques 24 puits ont été lavées par du PBS froid, puis lysées par un tampon de lyse, composé de 50mM de Tris pH 7,5 de 100mM NaCl, 2mM d'EDTA pH8, 1% de Triton 100X, et de 0,1% de SDS, additionné d'un inhibiteur de protéine (Protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Mannheim, Allemagne) selon les indications du fabricant. Les lysats cellulaires ont été récoltés, puis centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4 °C, pour éliminer les débris. Les surnageants ont été récupérés, additionnés de tampon de charge (tampon Laemmli) contenant 60mM de Tris pH 6,8 ; 2% de SDS, 10% de glycérol, 5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,01% de bleu de bromophénol puis chauffés pendant 15 min à 75 °C. La migration a été effectuée pendant 2 h dans un gel d'acryl/bis acryl à 15% en tampon Tris 0.025M/ glycine 0.192M/ SDS 0.1% à 90V.

Après migration, les protéines ont été transférées sur des membranes de PVDF (Polyvinylidene Fluoride, Hybond-p; Biosciences, Hercules CA, USA) activées au préalable par un bain de méthanol 100%, dans un tampon Tris 20 mM/ glycine 150 mM/ methanol 20% pendant 2 h à 100V. Les membranes ont été bloquées par un tampon de blocage (Tris 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, 0,05% Tween 20, 3% de BSA) pendant 1 heure à 25 °C, puis ont été incubées pendant une nuit à 4 °C dans une solution contenant l'anticorps primaire de lapin anti-LC3 (Novus, Littleton, CO, USA) ou de souris anti- $\alpha$ -tubuline (Invitrogen, Camarillo, CA USA) dilués respectivement au 1/3000 ou 1/5000 dans le tampon de blocage.

Après 3 lavages de 15 min en PBS/Tween 0,01%, les membranes ont été incubées pendant 45 min à 25 °C dans une solution contenant l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin ou de souris conjugué à de l'HRP (horseradish peroxidase, Promega, Madison, WI, USA) dilué au 1/5000 dans du tampon PBS/Tween 0,01%. Après 3 autres lavages, les membranes ont été révélées par chimioluminescence à l'aide d'une solution de détection ECL (ECL Plus, Western blotting reagent, Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La lumière émise a été détectée et analysée à l'aide du système Imager LAS-3000 (Fujifilm, Japon) et l'intensité de la bande a été quantifiée en utilisant le logiciel Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Japon).

#### - **Immunofluorescence et analyse par microscopie confocale**

Les cellules dendritiques ont été cultivées en plaques 24 puits sur des lamelles de verre stériles à  $0,2 \times 10^6$  cellules / ml. Elles ont été stimulées comme décrit précédemment (selon les temps de stimulation souhaités), puis fixées par du PFA (Paraformaldéhyde) à 4% en PBS pendant 15 min. Après lavage par du PBS, les cellules ont été perméabilisées à l'aide d'une solution de TRITON X100 à 10% (Sigma) pendant 5 min, puis les sites aspécifiques ont été bloqués 30 min par du SVF pur. Les cellules ont été ensuite incubées 1 h avec l'anticorps primaire de lapin anti-LC3 de souris (Anti-LC3 PM036, MBL) dilué au 1/100 dans du SVF.

Après 3 lavages de 5 min en PBS, les lamelles ont été incubées 45 min avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome (anticorps conjugué Alexa fluor 488, invitrogen) dilué au 1/500 dans du SVF. Après 3 lavages en PBS, la coloration du noyau a été réalisée à l'aide d'une solution de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, marqueur d'ADN émettant à 359/461 nm) diluée au 1/1000 en PBS pendant 5 min. Les cellules ont ensuite été lavées par du PBS et les lamelles ont été montées sur des lames de verre sur lesquelles ont été préalablement déposés 7 µl de Dako Fluorescence Mounting Medium (California, USA). La microscopie confocale a été réalisée à l'aide d'un microscope confocale à balayage laser (Zeiss, LSM 880).

### **Blocage de l'autophagie et stimulation des BMDC *in vitro***

Afin de confirmer le rôle de l'autophagie dans les capacités anti-inflammatoires des probiotiques, nous avons stimulé *in vitro* des BMDC (comme décrit précédemment) avec les souches probiotiques en bloquant l'autophagie par l'inhibiteur 3-méthyladenine (3-MA). Les BMDCs de souris ( $0,75 \times 10^6$  cellules / ml) ont été déposées dans des plaques de culture cellulaire 24 puits, puis pré-incubées pendant 1 h à 37 °C dans du milieu de culture en présence ou non de 3-MA (5 mM), avant d'être stimulées par les bactéries à un rapport bactéries / cellules de 10:1 en présence de 150 µg / ml de gentamycine. Après 18-20 h de co-culture, les surnageants de culture ont été recueillis, clarifiés par centrifugation et conservés à -20 °C jusqu'au dosage de la cytokine IL-1-Beta (IL-1β) réalisé par ELISA à l'aide de kits Duoset (R & D System, USA), selon les instructions du fabricant.

Pour le transfert cellulaire *in vivo*, les cellules ont été cultivées dans des boîtes de Pétri (culture cellulaire non traitée), à raison de  $5 \times 10^6$  cellules par boîte dans 10 ml d'IMDM, puis pré-incubées pendant 1 h à 37 °C dans un milieu de culture en présence ou non de 3-MA (5mM) avant d'être stimulées avec des bactéries à un rapport bactéries / cellules de 10:1 en présence de 150 ug / ml de gentamycine. Les BMDCs ont été lavées 3 fois dans du PBS et remises en suspension à  $2 \times 10^6$  cellules dans 200 µl. Aucune bactérie viable restante n'a été détectée dans les suspensions cellulaires, comme vérifié par étalement sur milieu MRS.

Pour le transfert de BMDCs de souris déficientes pour le gène codant l'ATG16L1, les BMDCs ont été différenciées à partir des moelles osseuses de souris C57BL/6 sauvages (WT), de souris contrôle (atg16l1 flox/flox) ou déficientes (atg16l1 flox/flox-CreLys), présentant une délétion spécifique d'ATG16L1 au niveau des cellules myéloïdes, fournies par le Dr Hang Nguyen (Inserm U1071, INRA USC 2018, Université Clermont Auvergne) en collaboration avec le Pr Rosentiel (UKSH University, Kiel, Allemagne). Les BMDCs ont été différenciées

comme décrit précédemment. Elles ont été stimulées avec la souche *L. rhamnosus* A2.21, à un rapport bactéries / cellules de 10:1 en présence de 150 µg / ml de gentamycine, puis lavées 3 fois dans du PBS et remises en suspension à  $2 \times 10^6$  cellules dans 200 µl.

## **Modèle murins de colite induite par l'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS)**

Des souris femelles BALB/c ByJ âgées de 7 à 8 semaines ont été fournies par la Société Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Elles ont été réparties au hasard en différents groupes (n =10 ou n=14 par groupe) et ont bénéficiées d'une période d'acclimatation d'une semaine au sein de l'animalerie SPF (sans pathogènes) de l'Institut Pasteur de Lille (numéro A59107, Lille, France) dans un environnement contrôlé (température de 22 °C, cycle lumière / obscurité de 12 h / 12 h et accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau). Les expérimentations animales ont été réalisées conformément aux lignes directrices du Comité d'éthique Français et aux normes de l'Union Européenne 86/609 / CEE, selon la législation Française (loi gouvernementale 87-848 et loi de 1976 sur la modification de la législation Européenne sur la cruauté envers les animaux). Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthiques déontologiques locales (CEEA N° 75, Lille, France) et le Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (numéro accréditation 201608251651940).

Les capacités anti-inflammatoires des probiotiques ont été évaluées *in vivo* à l'aide d'un modèle murin standardisé de colite aiguë induite par l'administration d'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) (Foligné et al., 2007a).

Les souris (n = 14 par groupe expérimental) ont reçu pendant six jours consécutifs avant, et un jour après l'administration de TNBS, une administration quotidienne de bactéries vivantes par voie intra-gastrique ( $0,5 \times 10^9$  CFU / jour) dans 100 µl de tampon de gavage (NaHCO<sub>3</sub> 200mM / glucose 1%) ou tampon de gavage seul (contrôle souris saines ou souris témoins traitées par le TNBS). Les souris ont été anesthésiées par l'injection intrapéritonéale d'un mélange contenant 3 mg de ketamine (Imalgene 1000; Merial Lyon, France), 46.7 µg de diazepam (Valium; Roche Diagnostics, France) et 15 µg d'atropine (Aguettant Laboratory, Lyon, France) dans du NaCl 0.9% (200 µl/souris) et ont ensuite reçu une administration intra-rectale de 50 µl d'une solution de TNBS (Sigma-Aldrich Chemical, France) dissout en solution NaCl 0,9% /éthanol (50/50 v/v), à une dose de 105 mg / kg. Les souris ont été sacrifiées 48 h après l'induction de la colite. Le score macroscopique d'inflammation a été déterminé par deux observateurs indépendants selon l'échelle de Wallace (Tableau 7) (Wallace et al., 1989) en évaluant l'intensité de l'inflammation et l'étendue des lésions (épaississement de la paroi intestinale, hyperhémie, intensité d'ulcération et de la nécrose

du côlon). La protection a été calculée en utilisant la formule suivante :  $100 \times \frac{(\text{score moyen du groupe TNBS} - \text{score moyen du groupe expérimental})}{\text{score moyen du groupe TNBS}}$ . Du sang a été prélevé par prélèvement rétro-orbital et le plasma a été récupéré par centrifugation, et conservé à -80 °C pour le dosage de l'Interleukine 6 (IL-6) par ELISA à l'aide d'un kit DuoSet (R&D System, Minneapolis, MN, USA) selon les indications du fabricant.

**Tableau 7 : Score macroscopique d'inflammation de Wallace.**

Valeur du score	Observations macroscopiques
<b>0</b>	Apparence normale du côlon
<b>1</b>	Hyperhémie localisée, faible épaissement, pas de nécrose
<b>2</b>	Hyperhémie, fort épaissement, pas de nécrose
<b>3</b>	Inflammation avec un point de nécrose
<b>4</b>	Inflammation avec 2 points ou plus de nécrose
<b>5</b>	Zone de nécrose > 1cm
<b>6 à 10</b>	Pour des zones de nécrose > 2cm le score augmente de 1 à chaque cm de nécrose supplémentaire

Des fragments de colon ont également été inclus en paraffine après fixation dans le Paraformaldéhyde à 4 % en PBS 1X, des coupes sériées (5 coupes par souris à 5 µm) ont été colorées par la coloration May Grunwald Giemsa (MGG). Le score histologique a été déterminé selon l'échelle d'Ameho (Tableau 8) (Ameho et al., 1997) en évaluant l'intensité de l'infiltrat inflammatoire, la présence d'œdème, d'ulcération et de nécrose cellulaire. Un segment de côlon correspondant à la région enflammée a été récupéré, nettoyé des matières fécales et stocké dans du tampon RNA-later® (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA) à -80 °C jusqu'à l'analyse par PCR en temps réel (qPCR). Un indice d'activité inflammatoire a été calculé en utilisant la combinaison des 7 marqueurs inflammatoires les plus importants (concentration en IL-6 plasmatique, expression des gènes codant TNF- $\alpha$ , CXCL2 et IL-6, score de Wallace, score d'Ameho et perte de poids).

Tous les paramètres ont été normalisés en % des données obtenues pour le groupe témoin TNBS et l'indice d'activité inflammatoire a été obtenu en calculant la moyenne de toutes les valeurs en % pour chaque groupe. La capacité des souches à restaurer la fonction de barrière épithéliale a également été résumée en calculant un indice d'intégrité de barrière colique combinant le % d'expression du gène codant les protéines de jonctions serrées (Occludine, Claudine 5 et ZO-1) par rapport au témoin Groupe TNBS.

**Tableau 8 : Score histologiques d'Amého.**

<b>Valeur du score</b>	<b>Observations microscopiques des coupes histologiques</b>
<b>0</b>	Histologie normale
<b>1</b>	Présence de légers infiltrats inflammatoires dans la muqueuse et/ou la sous-muqueuse et œdème; érosion ponctuelle de la muqueuse souvent associée avec une vascularisation; <i>muscularis mucosae</i> intacte
<b>2</b>	Grade 1 sur plus de 50 % de l'échantillon
<b>3</b>	Infiltrat inflammatoire important et œdème avec des zones d'ulcération profonde s'étendant jusqu'à la <i>muscularis mucosae</i> ; inflammation cellulaire rare envahissant la <i>muscularis propria</i> mais sans nécrose musculaire
<b>4</b>	Grade 3 sur plus de 50 % de l'échantillon
<b>5</b>	Ulcération importante avec des nécroses qui s'étendent profondément dans la <i>muscularis propria</i>
<b>6</b>	Grade 5 sur plus de 50% de l'échantillon

#### **Impact du blocage de l'autophagie *in vivo***

Afin de confirmer le rôle de l'autophagie sur les propriétés anti inflammatoires des souches probiotiques, les capacités protectrices des deux souches *L. rhamnosus* A2.21 et *L. acidophilus* CMUL067 ont été évaluées *in vivo* à l'aide du modèle murin de colite au TNBS comme décrit préalablement chez des souris traitées simultanément par de la 3-methyladenine.

Les souris (2 groupes de n = 10 par condition expérimentale) ont reçu pendant six jours consécutifs avant et un jour après l'administration de TNBS, une administration quotidienne de bactéries vivantes par voie intra-gastrique ( $0,5 \times 10^9$  CFU / jour) en 100 µl de tampon de gavage (NaHCO<sub>3</sub> 200 mM / glucose 1%) ou tampon de gavage seul (contrôle des souris saines ou des souris témoins traitées au TNBS). L'un des deux groupes a reçu simultanément et quotidiennement (jour 1 à 6) de la 3-MA (Sigma, 10 mg / kg) par voie intra-péritonéale. La colite a été induite comme décrit précédemment par une administration intra-rectale de 50µl d'une solution de TNBS dissout en NaCl 0,9% / éthanol (50/50 v/v), à une dose de 105 mg / kg. Les souris ont été sacrifiées 48 h après l'administration et les mêmes paramètres ont été évalués.



### **Impact du transfert de cellules dendritiques**

Afin d'évaluer le rôle de l'autophagie sur la capacité des souches à induire des cellules dendritiques immuno-régulatrices, un transfert de DCs préalablement sensibilisées par *L. rhamnosus* A2.21 en présence ou non d'un inhibiteur de l'autophagie a été réalisé chez des souris BALB/c et la protection a été évaluée en modèle de colite au TNBS, comme décrit précédemment (Macho Fernandez et al., 2011). Les BMDCs ont été traitées ou non par de la 3-MA (5 mM) pendant 1 h puis ont été stimulées ou non par les bactéries (MOI 10 bactéries par cellule) pendant une nuit tel que décrit précédemment. Les BMDCs ont été lavées deux fois en PBS puis ont été transférées à des souris BALB/c par administration intra-péritonéale ( $2 \times 10^6$  cellules / souris dans 200  $\mu$ l de PBS), 2 h avant l'induction de la colite par le TNBS à la dose de 95 mg / kg. Les souris ont été sacrifiées 48 h après l'induction de la colite et les mêmes paramètres ont été évalués.

Un transfert de BMDCs dérivées de souris déficientes pour l'ATG16L1 a été réalisé à partir de BMDCs dérivées de souris C57BL/6 sauvages (WT), de souris contrôle (atg16l1 flox/flox) ou déficientes (atg16l1 flox/flox-CreLys), sensibilisées par la souche *L. rhamnosus* A2.21, chez des souris C57BL/6 sauvages. Après administration intra-péritonéale des DCs ( $2 \times 10^6$  cellules / souris dans 200  $\mu$ l de PBS), la colite a été induite par du TNBS à une dose de 150 mg / kg. Les souris ont été sacrifiées 48 h après l'induction de la colite et les mêmes paramètres ont été évalués.

### **Modèle murin de colite induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS)**

Des souris BALB/c femelles âgées de 7 à 8 semaines ont été regroupées au hasard (n = 10 par groupe). La colite expérimentale a été induite en ajoutant 3,5% de DSS (poids moléculaire: 36 000-50 000, MP Biomedicals, LLC) à l'eau de boisson pendant 8 jours.

L'effet protecteur des probiotiques a été évalué par une administration quotidienne des bactéries vivantes par voie intra-gastrique ( $0,5 \times 10^9$  CFU/ jour/ souris) dans 100  $\mu$ l de tampon de gavage (NaHCO<sub>3</sub> 200mM / glucose 1%) ou les souris ont reçu du tampon de gavage seul (contrôle des souris saines ou des souris témoins traitées au DSS dès le premier jour de traitement avec le DSS à la fin de l'expérience).

La perméabilité intestinale a été mesurée avant le sacrifice par l'administration intra-gastrique de Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran 3000-5000 Da, Sigma-Aldrich) à raison de 500 mg / kg de poids corporel à des souris préalablement mises à jeun

pendant 6 h, suivie de la détermination de la quantité de FITC-dextran mesurée dans le sang 3 h après l'administration, tel que décrit par Cani *et al.* (Cani et al., 2009).

Le sang a été prélevé par prélèvement rétro-orbital. Le plasma a été récupéré par centrifugation et a été dilué avec un volume égal de PBS. Les courbes standard ont été obtenues par dilution sériée de différentes concentrations de FITC-dextran dans du plasma de souris saines et la concentration a été déterminée en utilisant un lecteur de microplaques à fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm.

La protection a été déterminée en mesurant l'impact des souches sur la perte de poids corporel, le raccourcissement du colon, et en évaluant l'intensité de l'inflammation après une analyse histologique des colons réalisée sur des coupes de tissus de 5 µm fixées dans du PAF à 4%, après inclusion dans de la paraffine et coloration au May-Grünwald Giemsa (5 sections par souris). Une partie du côlon correspondant à la région enflammée a été récupérée, nettoyée des matières fécales et stockée dans du tampon RNA-later® (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA) à -80 °C jusqu'à l'analyse par PCR en temps réel.

### **Extraction d'ARN et qRT-PCR**

Les échantillons de tissus ont été homogénéisés en utilisant les billes « Lysing Matrice D » (MP Bio, Solon, OH, USA) dans du tampon RA1 (kit d'extraction ARN NucleoSpin RNAII, Macherey-Nagel) et l'ARN total a été extrait selon les recommandations du fabricant (Macherey-Nagel, Allemagne). La quantité et la qualité d'ARN ont été déterminées à l'aide du nanodrop (260/280 nm, 260/230 nm), montrant un rapport de pureté supérieur à 1,95 dans tous les échantillons. La transcription inverse a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN total en utilisant le kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) a été réalisée à l'aide du mélange réactionnel « Power SYBR Green PCR Master Mix » (Applied Biosystems, Life technologies, Kingsland Grange, WA, UK). 2,5 µl d'ADNc (correspondant à 25 ng d'ARN) ont été amplifiés à l'aide du mélange réactionnel en présence d'amorces spécifiques à 200 nM dans un volume final de 10 µl à l'aide de l'appareil QuantStudio® (Applied Biosystems™). Les niveaux relatifs d'ARNm [ $2^{-\Delta\Delta CT}$ ] ont été déterminés en comparant 1) les seuils des cycles PCR (Ct) du gène d'intérêt et du gène de ménage Actb (Ct) et 2) les valeurs Ct des groupes d'animaux traités et non traités ( $\Delta\Delta CT$ ).

# ***RESULTATS***

## **Article 1 : Probiotiques et MICI : modèles *in vitro* et *in vivo*.pour la sélection de souches présentant des capacités anti-inflammatoires et des capacités à restaurer la barrière épithéliale intestinale.**

Mazen Zaylaa, Imad Al Kassaa, Jeanne Alard, Veronique Peucelle, Denise Boutillier, Jérémy Desramaut, Fouad Dabboussi, Bruno Pot et Corinne Grangette.

Probiotics in IBD: Combining *in vitro* and *in vivo* models for selecting strains with both anti-inflammatory potential as well as a capacity to restore the gut epithelial barrier.

Journal of Functional Foods (2018), 47: 304-315

### **Introduction**

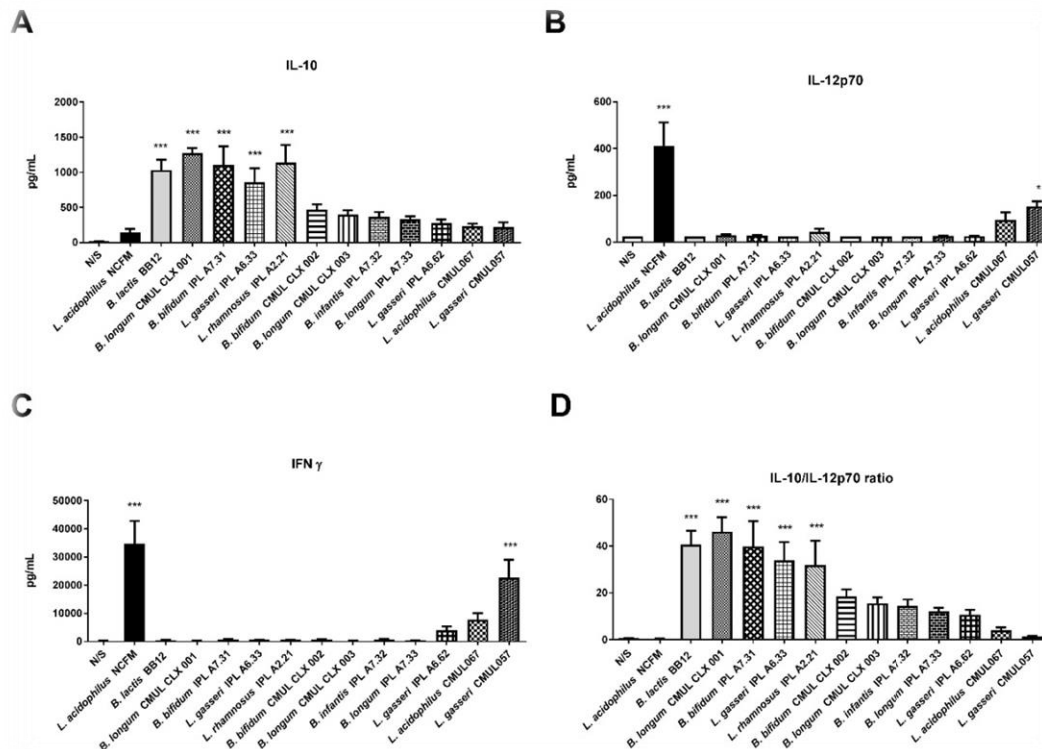
Les MICI sont caractérisées par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale, évoluant par des phases alternatives d'inflammation aiguë et de rémission. Une combinaison de facteurs à la fois génétiques, environnementaux, immunologiques et microbiologiques joue un rôle crucial dans le développement de la pathologie. Les thérapies actuelles ne sont pas curatives et sont associées à de nombreux effets secondaires. De nouvelles stratégies sont donc attendues, notamment des traitements plus naturels et mieux ciblés sur les facteurs impliqués. Les MICIS sont associées à une perte de l'intégrité de la barrière intestinale, une dysbiose du microbiote et une perte de tolérance vis-à-vis de ce microbiote chez des sujets génétiquement susceptibles. L'utilisation de probiotiques capables de restaurer ces perturbations est donc proposée comme une alternative intéressante du fait de leur innocuité. Néanmoins, leurs effets sont souche-spécifiques et restent peu efficaces dans la prise en charge de la maladie de Crohn (MC). Notre étude a donc visé à cribler *in vitro* une collection de souches pour leurs capacités anti-inflammatoires et leurs capacités à restaurer une barrière épithéliale et confirmer leurs capacités protectrices dans deux modèles de colite aiguë et de bas grade chez la souris.

### **Résultats**

#### **Sélection de souches anti-inflammatoires *in vitro***

Afin de déterminer les profils immunomodulateurs des souches probiotiques sélectionnées (Tableau 6, M&M), les cellules mononuclées isolées de sang humain ont été stimulées par les bactéries et la production de cytokines a été mesurée dans les surnageants. Deux souches, *Lactobacillus acidophilus* NCFM et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12

présentant respectivement des profils pro-Th1 et anti-inflammatoires ont été utilisées comme souches de référence (*Burns et al., 2017; Foligné et al., 2007a*). Comme le montre la Figure 1, la majorité des souches ont pu induire la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, contrairement aux cellules non traitées, cependant nous observons un effet souche, avec des valeurs comprises entre 200-1200 pg / ml. D'autre part, la plupart des souches ont induit des taux très faibles de cytokines pro-Th1 (IL-12 et IFN- $\gamma$ ), sauf *L. gasseri* CMUL057 ( $p < 0,05$ ) et *L. acidophilus* CMUL067 ( $p = NS$ ) qui ont induit des taux plus élevés de ces deux cytokines, mais restant en dessous du niveau de la souche de référence *L. acidophilus* NCFM ( $p < 0,001$ ). *B. longum* CMUL CXL 001, *B. bifidum* IPL A7.31, *L. rhamnosus* IPL A2.21 et *L. gasseri* IPL A6.33 ont induit les niveaux les plus forts d'IL-10 tout en étant de faibles inducteurs d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$ , mis en évidence par un rapport IL-10 / IL-12 élevé avec des niveaux similaires à ceux obtenus pour la souche de référence *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 ( $p < 0,001$ ).

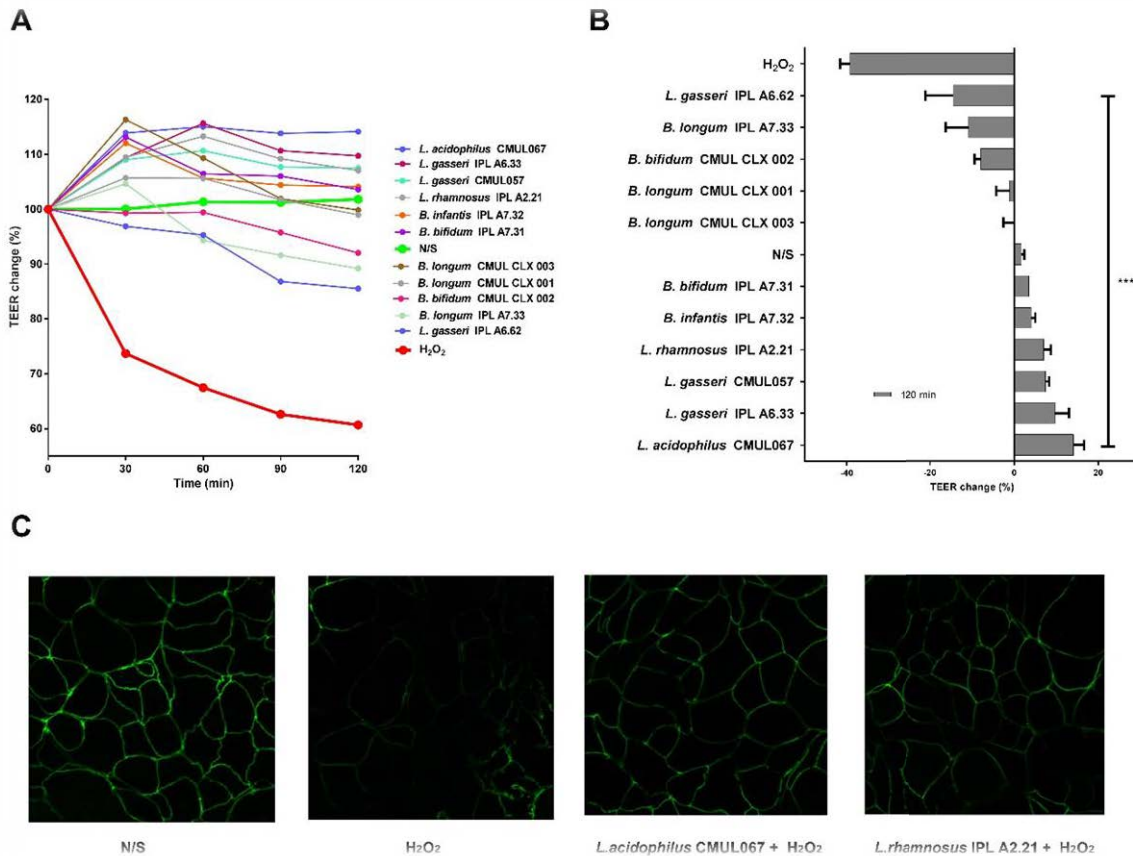


**Fig. 1. Profils immunomodulateurs *in vitro* des souches**

La production de cytokines a été évaluée dans les surnageants de PBMC ( $n = 5$  donneurs différents) stimulés pendant 24h par les souches testées et par deux souches témoin (*L. acidophilus* NCFM et *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12), en comparaison avec des cellules non traitées (NS). Les résultats indiquent les niveaux de (A) IL-10, (B) IL-12p70, (C) IFN- $\gamma$  et (D) le rapport calculé IL-10 / IL-12. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 5 donneurs indépendants. \* fait référence à la comparaison de PBMC stimulés par les bactéries et des cellules non traitées; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$

## **Les souches potentiellement probiotiques ont limité la perturbation de la fonction barrière de la monocouche épithéliale sensibilisée par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Plusieurs études ont montré que le peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) perturbe les jonctions serrées et augmente la perméabilité paracellulaire dans des modèles de barrière épithéliale dérivée de cellules Caco-2 (Seth et al., 2008). Dans la présente étude, les souches sélectionnées ont été évaluées pour leur capacité à restaurer la monocouche de cellules Caco-2 fragilisée par une sensibilisation à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comme cela a été récemment rapporté (Alard et al., 2018). Comme le montre la Figure 2A-B, l'addition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les monocouches de cellules Caco-2 (courbe rouge) a entraîné une diminution significative (-39,3% après 120 min) de la résistance transépithéliale (TEER). Le traitement des cellules avec les souches probiotiques a réduit de manière significative les dommages causés à la barrière épithéliale induits par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ceci de façon dépendante du temps et de la souche (p <0,001 pour toutes les souches testées). Cependant, *B. longum* CMUL CXL 001, *B. bifidum* CMUL CXL 002, *B. longum* CMUL CXL 003 et *L. gasseri* IPL A6.62 ont montré une suppression partielle de la chute de la TEER induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, passant de - 0,5 à - 14,49%. De façon intéressante, certaines souches ont même montré une forte capacité à renforcer cette barrière en augmentant le niveau de TEER au-dessus du niveau obtenu pour les cellules non traitées (courbe verte). En effet, *L. acidophilus* CMUL067, *L. gasseri* IPL A6.33, *L. gasseri* CMUL057, *L. rhamnosus* IPL A2.21, *B. bifidum* IPL A7.31 et *B. longum* subsp. *infantis* IPL A7.32 ont conduit à une augmentation reproductible et significative de la TEER allant de +3,5 à + 14,1%. L'impact des souches sur la rupture de la monocouche cellulaire induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'était pas dû à une dégradation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce que nous avons vérifié en mesurant la concentration résiduelle en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après co-incubation avec des bactéries pendant 120 min dans les mêmes conditions que celles utilisées dans le modèle de barrière épithéliale (Tableau S1). L'effet protecteur des souches sur la restauration de la barrière épithéliale a été confirmé par l'analyse de la distribution cellulaire de ZO-1 par immunofluorescence et microscopie confocale (Figure 2C). Contrairement aux cellules non traitées qui présentaient un profil de marquage bien défini de ZO-1 au niveau des jonctions intercellulaires, la distribution de ZO-1 était fortement altérée pour les cellules sensibilisées par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avec une diminution de l'expression en surface des cellules. Cette perturbation des jonctions serrées induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été limitée par le prétraitement avec toutes les souches, comme le montrent deux images représentatives pour les souches *L. acidophilus* CMUL067 et *L. rhamnosus* IPL A2.21.



**Fig. 2. Capacité de souches à prévenir et à restaurer la perturbation de la barrière épithéliale induite par  $H_2O_2$**

Les bactéries ont été ajoutées au côté apical des monocouches de Caco-2 à une MOI = 10. Après 30 min, les monocouches ont été sensibilisées avec de l' $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) et la TEER a été mesurée toutes les 30 min. Les expériences ont été effectuées en triplicat et les données représentent (A) les moyennes des changements relatifs des TEER  $\pm$  SEM (en %) en fonction du temps par rapport aux cellules non sensibilisées (T0) et (B) les variations finales des TEER (en %) à 120 min. \* se réfère à la comparaison des cellules traitées avec des bactéries par rapport aux cellules sensibilisées avec  $H_2O_2$  seul; \*\*\* p < 0,001. (C) Des monocouches de cellules Caco-2 ont été incubées avec les souches pendant 30 min avant le traitement par  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M). Deux heures après le traitement, les cellules ont été fixées et un marquage de la protéine jonction serrée ZO-1 a été réalisé par immunofluorescence. Les images ont été analysées par microscopie confocale.

## L'administration orale des souches bactériennes atténue la colite aiguë induite par le TNBS chez la souris

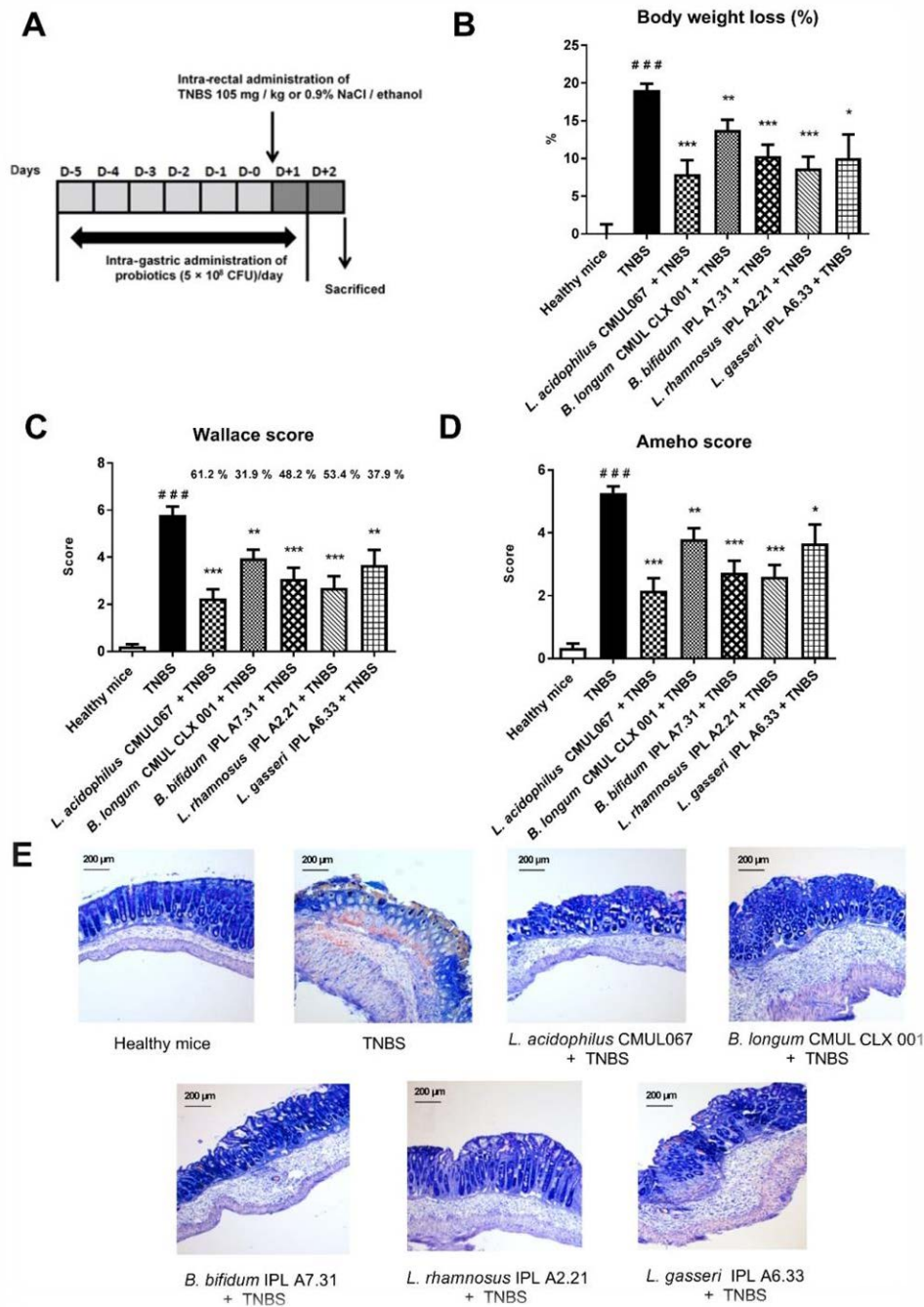
Pour les expériences *in vivo*, quatre souches (*B. longum* CMUL CXL 001, *B. bifidum* IPL A7.31, *L. rhamnosus* A2.21 et *L. gasseri* IPL A6.33) ont été sélectionnées sur la base de leurs profils anti-inflammatoires *in vitro* (rapport élevé IL-10 / IL-12). Nous avons de plus sélectionné la souche *L. acidophilus* CMUL067 en raison de sa capacité à renforcer la fonction barrière des monocouches de cellules Caco-2 et présentant à l'inverse un faible profil anti-inflammatoire

*in vitro* mesuré sur les cellules mononuclées isolées de sang humain. Un modèle murin de colite aiguë induite par l'administration intrarectale de TNBS (105 mg / kg, Figure 3A) bien établi au laboratoire a été utilisé pour évaluer *in vivo* les effets protecteurs potentiels des souches. L'administration de TNBS a entraîné une perte de poids importante avec une chute moyenne d'environ 18,3%, 48 heures après l'induction de la colite (Figure 3B) et a conduit à une forte inflammation, soulignée par des scores d'inflammation élevés au niveau macroscopique (score de Wallace de 5,8) et histologique (score d'Ameho de 5,26) par rapport aux animaux témoins non traités (Figure 3D-E).

Toutes les souches sélectionnées ont pu limiter de manière significative la colite (Figure 3B, C et D), mais avec une efficacité variable. Les quatre souches présentant le meilleur potentiel anti-inflammatoire *in vitro* ont protégé les souris de façon significative (31,9 à 53,4% de protection, Figure 3C). *B. bifidum* IPL A7.31 et *L. rhamnosus* IPL A2.21 ont conduit au meilleur taux de protection (48,2% et 53,4% respectivement). De façon intéressante, *L. acidophilus* CMUL067, qui ne montrait pas un profil anti-inflammatoire *in vitro* (faible induction d'IL-10), mais qui présentait les meilleures performances dans le modèle de barrière épithéliale, s'est montré être la souche la plus protectrice dans le modèle de colite, entraînant la plus forte diminution des scores macroscopiques (Figure 3C, protection 61,2%) et histologiques (Figure 3D) de l'inflammation. La capacité de protection des souches a été corrélée à une diminution significative de la perte de poids par rapport aux souris ne recevant que du tampon de gavage (groupe témoin TNBS, Figure 3B).

Comme le montre la Figure 4, les souris traitées par le TNBS ont présenté une réponse inflammatoire élevée, caractérisée par une forte augmentation de la concentration plasmatique en IL-6 ( $p < 0,001$ ) et de l'expression colique des gènes inflammatoires codant pour l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , CXCL2 et l'IL-17 ( $p < 0,001$ ), comparativement aux souris non traitées témoins. De manière remarquable, l'administration de toutes les souches étudiées a conduit à une forte réduction significative des taux d'IL-6 plasmatique et de l'expression de gènes inflammatoires. *L. acidophilus* CMUL067 a présenté la meilleure capacité, en limitant tous les marqueurs inflammatoires, tandis que la souche *B. longum* CMUL CXL 001 a été la moins efficace, bien que les effets protecteurs soient restés significatifs pour tous les paramètres testés, à l'exception de l'expression d'*il17*. Ces résultats corroborent les niveaux de protection rapportés par la diminution des scores d'inflammation de Wallace et d'Ameho, qui était plus élevés pour la souche de *L. acidophilus* et plus faibles pour la souche de *B. longum*. Cela a également été démontré en calculant un indice d'activité inflammatoire qui s'est avéré être le plus faible pour la souche *L. acidophilus* et le plus élevé pour la souche *B. longum*.

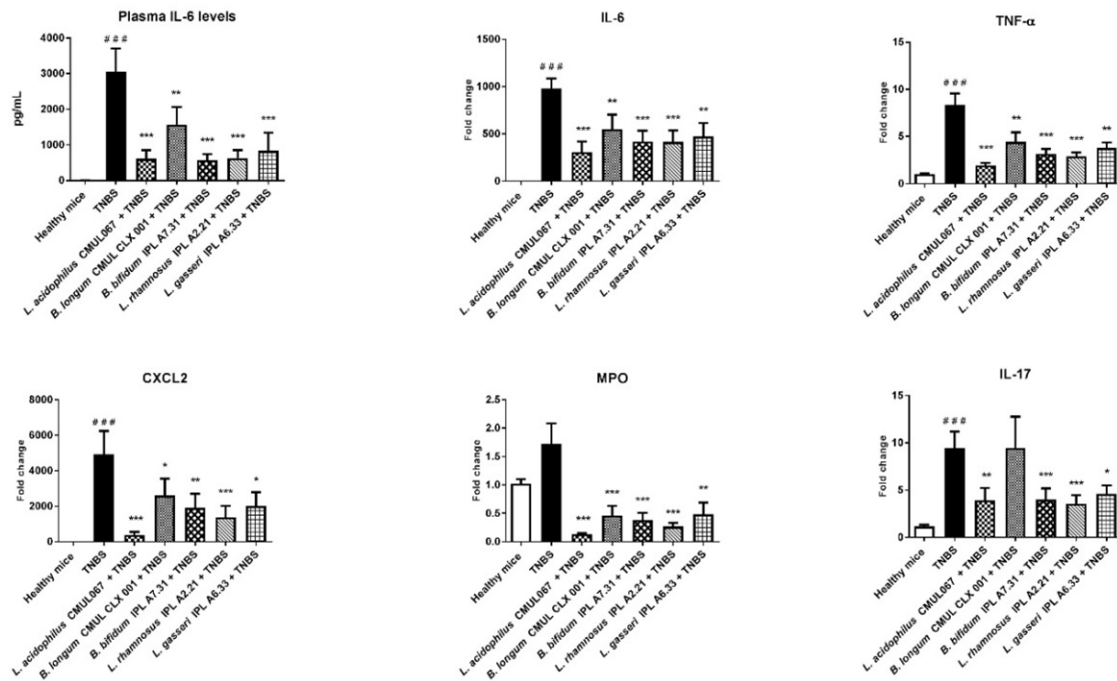




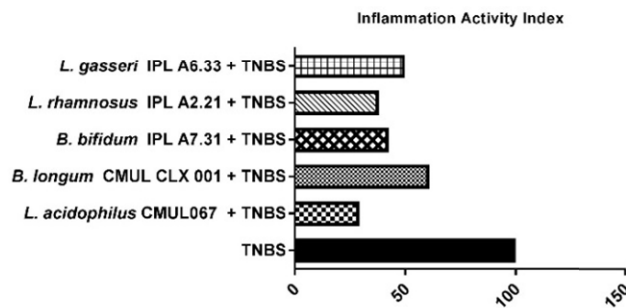
**Fig. 3. Les souches bactériennes ont protégé les souris d'une colite aiguë induite par le TNBS**

(A) Protocole expérimental utilisé pour le modèle murin de colite aiguë induite par l'administration intrarectale de TNBS (105 mg / kg) (B) Perte de poids corporel (en pourcentage du poids initial) (C) Évaluation macroscopique de l'inflammation colique (score de Wallace). Les pourcentages de protection sont indiqués au-dessus de chaque barre (D) Évaluation histologique de l'inflammation colique (score d'Ameho) (E) Coupes histologiques représentatives (colorées par May Grünwald Giemsa, grossissement 100X) de souris traitées ou non par le TNBS, et ayant reçu ou non les bactéries par voie orale. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM. \* et # se réfèrent respectivement à la comparaison des groupes de souris traitées par les bactéries versus le groupe témoin TNBS ou du groupe TNBS par rapport à des souris saines ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* ou ###  $p < 0,001$ .

**A**



**B**

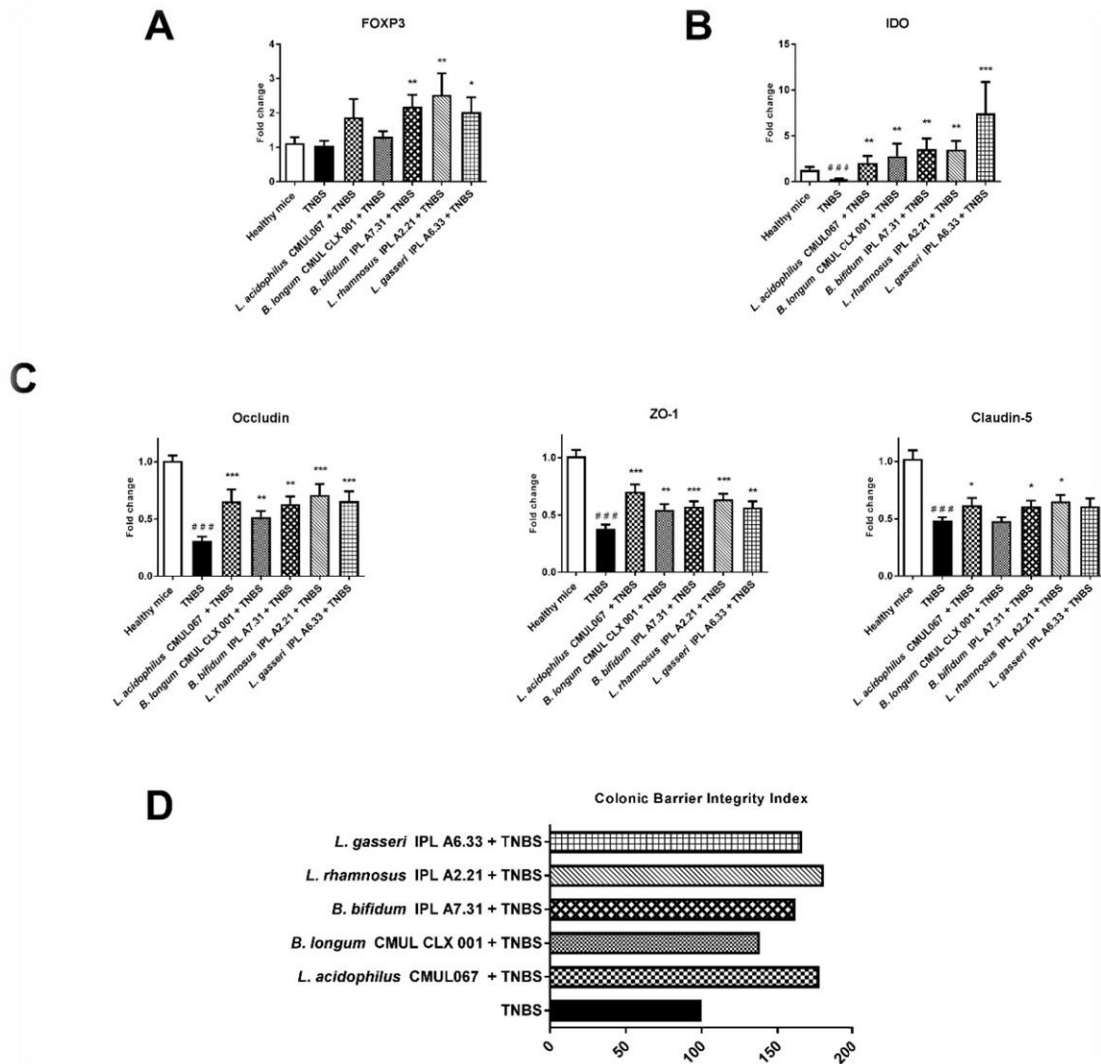


**Fig. 4. Les souches bactériennes diminuent les marqueurs d'inflammation associés à la colite induite par le TNBS.**

(A) Les concentrations plasmatiques d'IL-6 ont été mesurées deux jours après l'induction de la colite par ELISA. L'expression génique de *cxcl2*, *il17*, *tnfa*, *il6* et *mpo* a été évaluée par qRT-PCR à partir d'échantillons de colons obtenus deux jours après l'induction de la colite. Les valeurs sont exprimées en niveaux d'ARNm relatifs comparés aux colons de souris saines. Les données représentent les valeurs moyennes de chaque groupe (n = 14 souris) ± SEM. \* et # se réfèrent respectivement à la comparaison des groupes de souris traitées par les bactéries versus le groupe témoin TNBS ou du groupe TNBS par rapport à des souris saines; \*, p <0,05; \*\*, p <0,01 ou \*\*\* ou ### p <0,001. (B) L'indice d'activité inflammatoire calculé à partir de la combinaison des concentrations plasmatiques d'IL-6, de l'expression des gènes d'ARNm coliques pour *cxcl2*, *tnfa* et *il6*, des scores de Wallace, des scores d'Ameho et de la perte de poids.

Les effets protecteurs de *B. bifidum* IPL A7.31, *L. rhamnosus* IPL A2.21 et *L. gasseri* IPL A6.33 ont été associés à une augmentation significative de l'expression de *foxp3*, suggérant qu'une réponse cellulaire de type T régulatrice pourrait être impliquée dans les effets bénéfiques observés (Figure 5A). De plus, les capacités protectrices des souches étaient également corrélées à une régulation positive de l'expression du gène *Ido*.

Afin de mieux comprendre le mécanisme lié aux effets protecteurs des souches, nous avons étudié leur impact sur l'expression de gènes codant pour des protéines de jonctions serrées, structures clés pour maintenir l'intégrité de la barrière intestinale (Occludine, Claudine 5 et ZO-1) (Figure 5C). Chez les souris traitées au TNBS, l'administration des souches sélectionnées a augmenté significativement les ARNm de l'Occludine, de la Claudine 5 et de ZO-1, par comparaison avec les souris témoins traitées au TNBS. En particulier, *L. acidophilus* CMUL067 a entraîné la plus forte augmentation de l'expression du gène codant ZO-1 et l'occludine ( $p < 0,001$ ), confirmant la capacité observée *in vitro* de cette souche à renforcer la barrière épithéliale (Figure 2). Cette souche, ainsi que *L. rhamnosus* IPL A2.21, présentait l'indice d'intégrité de la barrière colique le plus élevé (Figure 5D).

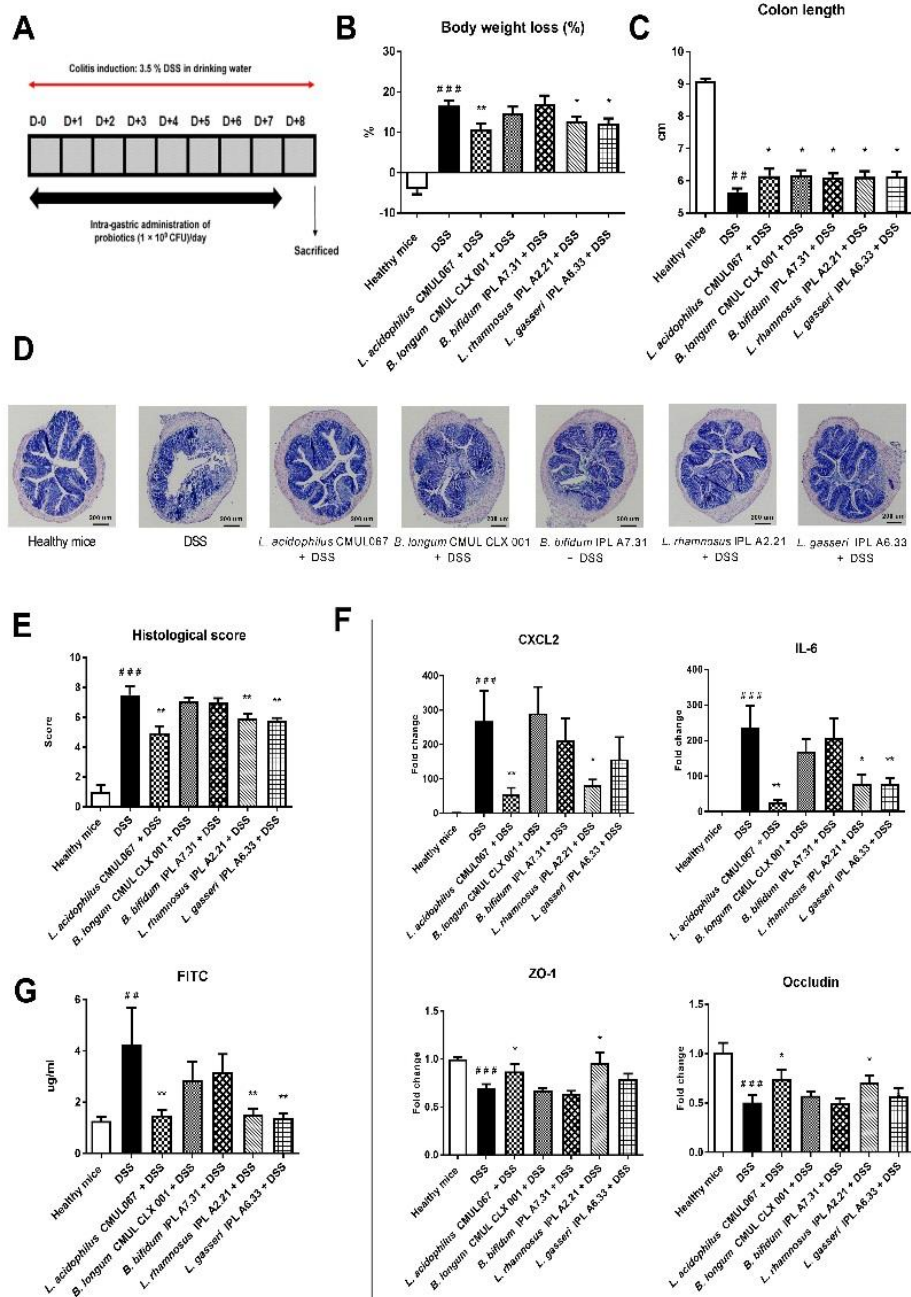


**Fig. 5. Les souches bactériennes ont augmenté l'expression génique des marqueurs de régulation et des gènes codants protéines de jonction serrée**

L'expression génique de (A) *foxp3*, (B) *ido*, (C) *occludine*, *zo-1* et *claudin-5* à partir d'échantillons de colons obtenus deux jours après l'induction de la colite. Les valeurs sont exprimées en taux relatif d'ARNm des échantillons comparé aux colons de souris saines. Les données représentent les valeurs moyennes de chaque groupe (n = 14) ± SEM. \* et # font référence respectivement à la comparaison du groupe témoin traité avec les bactéries versus le groupe témoin TNBS ou le TNBS versus les souris saines; \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* ou ### p <0,001 (D) L'indice d'intégrité de la barrière colique calculé à partir de la combinaison de l'expression génique de l'ARNm codant les différentes protéines de jonction serrée Occludin, Claudin-5 et ZO-1.

## **L'administration orale des souches bactériennes a atténué une colite de bas grade induite par le DSS chez la souris et a amélioré l'intégrité de la barrière intestinale**

Pour confirmer les capacités anti-inflammatoires des souches sélectionnées et leur capacité à restaurer l'intégrité de la barrière épithéliale, nous avons évalué leur effet protecteur dans un modèle de colite induite par du Dextran Sulfate de sodium (DSS) (Figure 6A). L'addition d'une faible dose de DSS (3,5%) dans l'eau de boisson a entraîné une perte de poids significative des souris et un raccourcissement de la longueur de leur côlon (Figure 6B et C), mais comme indiqué par l'analyse histologique (Figure 6D-E), l'inflammation intestinale a été inférieure à celle observée dans le modèle de colite aiguë induite par le TNBS. Les souris traitées par le DSS ont présenté une réponse inflammatoire caractérisée par une augmentation significative par rapport aux souris témoins non traitées de l'expression colique des gènes inflammatoires codant l'IL-6 et CXCL2 ( $p < 0,001$ ), mais de niveau inférieur à celui observé dans le modèle TNBS (Figure 6F). De manière remarquable, toutes les souches testées ont été capables d'améliorer les paramètres inflammatoires, les résultats étant significatifs uniquement pour les souches *L. acidophilus* CMUL067 et *L. rhamnosus* IPL A2.21. De façon importante, nous avons confirmé que ces deux souches étaient également capables d'augmenter significativement ( $p < 0,05$ ) l'expression de gènes de jonctions serrées et de réduire la perméabilité intestinale, mise en évidence par un test de perméabilité utilisant le FITC-dextran (Figure 6F-G). En effet, les souris traitées au DSS présentaient un taux plasmatique de FITC-dextran multiplié par 3,3 par rapport au niveau basal obtenu chez les souris témoins alors que les souris traitées par les deux souches probiotiques montraient un niveau similaire au niveau basal ( $p < 0,01$ ).



**Fig. 6. Les souches bactériennes ont protégé les souris d'une colite de bas grade induite par le DSS** (A) Protocole expérimental utilisé pour le modèle murin de colite de bas grade induit par la consommation de DSS à 3,5% dans l'eau de boisson (B) Perte de poids corporel (en pourcentage du poids initial) (C) Raccourcissement de la longueur du côlon (D) Coupes histologiques (colorées par May Grünwald Giemsa, grossissement 100X) représentatives de souris traitées (DSS) ou non (souris saines) par le DSS à 3,5%, traitées ou non par voie orale avec les souches bactériennes. (E) Évaluation histologique du score d'inflammation colique. (F) Expression génique de *cxcl2*, *il6*, *zo1* et *occludin* à partir d'échantillons de colon. Les valeurs sont exprimées en taux relatifs d'ARNm des échantillons comparés aux colons de souris saines (G) Concentration plasmatique de dextran FITC. Les données représentent les valeurs moyennes de chaque groupe ( $n = 10$ )  $\pm$  SEM. \* et # se rapportent respectivement à la comparaison du groupe traité avec les bactéries par rapport au groupe témoin DSS ou au DSS versus les souris saines; \*  $p < 0,05$ , \*\* ou ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ .

## Discussion

Les MICIs sont des maladies multifactorielles associées à des facteurs génétiques et environnementaux, pour lesquels les traitements restent peu efficaces. Par conséquent, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est devenue essentielle pour réduire la morbidité et la mortalité liées aux MICIs. Puisque les MICIs sont associées i) à la dysbiose intestinale du microbiote, ii) à la perméabilité intestinale iii) au déséquilibre des réponses immunitaires, la restauration de ces fonctions intestinales est devenue une alternative intéressante pour le traitement futur des MICIs (Singh et al., 2013). Dans ce contexte, les probiotiques sont apparus comme une nouvelle stratégie thérapeutique pour la prévention et/ou le traitement de la dysbiose intestinale associée à une inflammation des muqueuses (Orel and Kamhi Trop, 2014). De ce fait, des suppléments probiotiques, en particulier des probiotiques appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, ont été utilisés avec succès chez des patients atteints de RCH (Saez-Lara et al., 2015). Cependant, leurs effets protecteurs se sont révélés dépendants de la souche et plusieurs souches probiotiques bien connues n'ont pas réussi à atteindre les résultats cliniques attendus, en particulier lorsqu'elles ont été appliquées chez des patients atteints de la MC (Lichtenstein et al., 2016). De toute évidence, il est nécessaire de mieux comprendre leurs mécanismes d'action et de définir des critères de sélection appropriés pour optimiser la sélection de souches ou de mélanges pour une utilisation optimale chez les patients atteints de MICI.

Dans la présente étude, nous avons étudié une collection de onze nouvelles souches, cinq lactobacilles et six bifidobactéries, à l'aide de modèles *in vitro* évaluant à la fois les capacités anti-inflammatoires et les capacités à restaurer la barrière épithéliale. Nous avons précédemment mis en évidence que *L. gasseri* CMUL057 présentait une activité antivirale contre l'herpès simplex de type 2 (Kassaa et al., 2015). Les présents résultats confirment le potentiel immunostimulateur de cette souche, car elle induit les taux les plus élevés de cytokines pro-Th1 parmi les souches testées, même supérieur à ceux de la souche de référence NCFM connue pour ses capacités à induire des cytokines pro-Th1 (Foligné et al., 2007a). Quatre souches, *B. longum* CMUL CXL 001, *B. bifidum* IPL A7.31, *L. rhamnosus* IPL A2.21 et *L. gasseri* IPL A6.33 ont présenté le meilleur profil anti-inflammatoire *in vitro* caractérisé par un rapport IL-10 /IL-12 élevé, de même niveau que celui obtenu avec la souche de référence anti-inflammatoire *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Burns et al., 2017). Nous avons précédemment rapporté que les profils immunomodulateur *in vitro* des probiotiques sont spécifiques de souche et notamment que leur capacité à induire de l'IL-10 est corrélée à leurs effets protecteurs *in vivo* dans des modèles murins de colite (Foligné et al., 2007a; Mileti et al., 2009). La rupture de la barrière épithéliale, conduisant à une

"hyperperméabilité", est impliquée dans le développement de l'inflammation des muqueuses (Ahmad et al., 2017; Natividad and Verdu, 2013); nous avons de ce fait évalué la capacité des souches sélectionnées à restaurer une monocouche de cellules épithéliales (Caco-2) sensibilisées par du peroxyde d'hydrogène. Comme cela a été démontré précédemment (Alard et al., 2018; Seth et al., 2008), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a augmenté la perméabilité paracellulaire, démontrée par une chute de la TEER et la perturbation des jonctions serrées observée par un immuno-marquage de ZO-1. Toutes les souches testées ont pu restaurer la TEER et même renforcer la barrière épithéliale. Les meilleures capacités ont été obtenues avec *L. acidophilus* CMUL067, *L. gasseri* IPL A6.33, *L. gasseri* CMUL057, *L. rhamnosus* IPL A2.21, *B. longum* subsp. *infantis* IPL A7.32 et *B. bifidum* IPL A7.31, pour lesquelles nous avons également observé une limitation de la perturbation du marquage ZO-1 induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La souche *L. acidophilus* CMUL067 s'est montrée la plus performante pour renforcer la fonction barrière. Il a été démontré que *L. rhamnosus* GG protège l'épithélium intestinal du stress oxydatif (Yoda et al., 2014), grâce à la sécrétion de deux protéines solubles (p40 et p75) capables d'atténuer la perturbation des jonctions serrées et adhérentes, respectivement ZO-1, E-cadhérine et  $\beta$ -caténine, induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les monocouches de cellules Caco-2 (Seth et al., 2008). L'effet protecteur était lié à de multiples voies de signalisation, notamment à l'activation de la PKC, apparemment impliquées dans l'amélioration de la perméabilité paracellulaire. Hsieh *et al.* ont également montré que différentes espèces de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* protègent les cellules épithéliales intestinales de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Hsieh et al., 2015). L'effet de la meilleure souche protectrice, *B. bifidum*, a été aboli en utilisant des bactéries tuées par la chaleur, ce qui suggère que des métabolites bactériens pourraient être impliqués. Fait intéressant, ils ont observé une production accrue d'acétate et de formate dans la co-culture des Caco-2 et des bifidobactéries ajoutées vivantes. Des études antérieures (Suzuki et al., 2008) ont également signalé une augmentation de la fonction de barrière épithéliale avec l'acétate, suggérant que cet AGCC pourrait être impliqué dans le renforcement de l'effet barrière des probiotiques. Ce mécanisme reste à élucider.

Nous avons ensuite combiné les capacités anti-inflammatoires des souches avec leur capacité à renforcer la barrière épithéliale afin de sélectionner les meilleures souches pour évaluer leur capacité protectrice *in vivo* dans un modèle de colite aiguë induit par le TNBS. Nous avons sélectionné les quatre souches présentant un profil anti-inflammatoire élevé (*B. longum* CMUL CXL 001, *B. bifidum* IPL A7.31, *L. rhamnosus* A2.21 et *L. gasseri* IPL A6.33), capables également de restaurer la barrière épithéliale, ainsi que la souche *L. acidophilus* CMUL067, qui était la souche la plus performante à renforcer la barrière épithéliale, mais dénué de potentiel anti-inflammatoire *in vitro*.



Les cinq souches sélectionnées ont été capables de prévenir la colite aiguë induite par le TNBS chez les souris BALB/c, démontré par une réduction significative des scores macroscopiques et histologiques d'inflammation. Cette protection a été corrélée avec une réduction significative de l'expression des gènes coliques codant pour les marqueurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6, MPO, IL-17 et CXCL2 et des taux plasmatiques d'IL-6. Fait intéressant, la meilleure protection a été obtenue avec la souche *L. acidophilus* CMUL067, capable de renforcer la barrière intestinale mais pas d'induire *in vitro* des niveaux significatifs d'IL-10 après stimulation de cellules immunes. Il a été rapporté que certains bifidobactéries à faible potentiel immunomodulateur *in vitro* sont quand même capables de prévenir les symptômes cliniques dans un modèle murin de colite induite par du DSS en améliorant la fonction barrière épithéliale (Mileti et al., 2009; Srutkova et al., 2015b). Nous supposons donc que ce critère est important pour la sélection de souches probiotiques potentielles dans le contexte des MICIs.

Les lymphocytes Th1 et Th17 infiltrants, qui produisent des cytokines pro-inflammatoires, sont impliqués dans le développement des MICI et des dommages aux muqueuses. Les cytokines inflammatoires sont connues pour avoir un impact sur l'intégrité épithéliale par la modulation de l'expression et de la fonction des protéines de jonctions serrées. Notamment, le TNF- $\alpha$  provoque la redistribution de ZO-1 et de la claudine (Mankertz et al., 2000). Inversement, des réponses immunitaires compensatoires pourraient être activées pour protéger le développement de la colite. Une dynamique croisée entre les cellules épithéliales et immunitaires est donc impliquée dans l'homéostasie intestinale. La perturbation de cet équilibre favorise un environnement inflammatoire pouvant entraîner une inflammation chronique (Ahmad et al., 2017). Les réponses régulatrices jouent notamment un rôle critique dans le contrôle de cet équilibre et aident au maintien de l'homéostasie immunitaire des muqueuses. Des déséquilibres entre Treg et Th17 ont été rapportés dans les MICIs (Gong et al., 2016), l'induction de Treg pourrait donc être une cible dans la prise en charge de ces pathologies. Nous avons observé que l'effet protecteur de *B. bifidum* IPL A7.31, *L. rhamnosus* IPL A2.21 et *L. gasseri* IPL A6.33 était lié à une augmentation significative de l'expression de *foxp3*, suggérant qu'une réponse cellulaire régulatrice pourrait être impliquée dans l'effet protecteur observé. Nos résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Zuo *et al.*, montrant que l'effet protecteur d'une souche de *B. infantis* dans la colite induite par le TNBS est associé à une régulation négative des réponses Th1 et Th17 et à une augmentation de Tregs FoxP3<sup>+</sup> (Zuo et al., 2014). Un mélange de probiotiques a également permis la conversion des cellules T en Tregs Foxp3<sup>+</sup> par induction de DCs régulatrices qui expriment des taux élevés d'IL-10, de TGF- $\beta$ , de COX-2 et d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Kwon et al., 2010). Nous avons également montré précédemment que des probiotiques sélectionnés sont capables d'induire des DC

régulatrices *in vitro*, capables de conférer un effet protecteur dans le modèle de colite induite par le TNBS après transfert adoptif *in vivo* (Foligné et al., 2007b). La protection était associée à une expression locale élevée de l'enzyme immunosuppressive IDO, connue pour être utilisée par les DC tolérogènes pour induire l'expansion des Treg, par épuisement du tryptophane (Grohmann et al., 2003). Fait intéressant, les capacités de protection de nos souches étaient également corrélées à une up-régulation du gène intestinal *Ido*.

Enfin, nous avons confirmé dans le modèle TNBS que les cinq souches sélectionnées étaient capables de restaurer la fonction barrière épithéliale. En effet, la chute de l'expression des gènes de jonctions serrées (ZO-1, Occludine et Claudin 5) observée chez les souris traitées par le TNBS était significativement limitée chez les souris prétraitées avec les souches confirmant leur capacité à renforcer la barrière intestinale et à limiter les lésions épithéliales. Tous ces résultats ont été confirmés dans un modèle de colite de bas grade induit par la consommation de DSS à 3,5% dans l'eau de boisson. De façon importante dans ce modèle, nous avons pu montrer *in vivo* l'impact positif de trois souches sur la restauration de l'intégrité de la barrière épithéliale, montrant une amélioration de la perméabilité intestinale, comme le souligne le passage réduit du FITC-dextran. Nos résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle la capacité des souches à atténuer l'inflammation est en partie due à l'amélioration de la barrière intestinale et à la restauration des protéines de jonctions serrées, déjà rapportée par d'autres dans différents modèles de colite (Martín et al., 2016; Srutkova et al., 2015b; Yoda et al., 2014). Cela devrait être notamment le facteur clé de l'effet bénéfique de la souche *L. acidophilus* CMUL067 la plus performante à renforcer la barrière intestinale, mais incapable d'induire des cytokines régulatrices.

## Conclusions

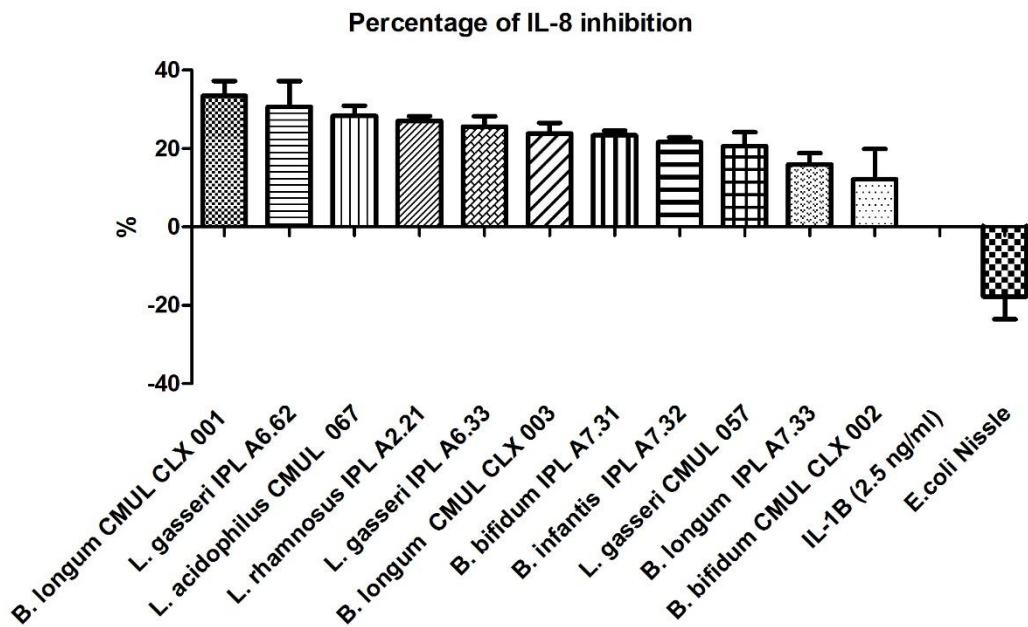
Nos approches expérimentales combinant des modèles *in vitro* pour cribler les souches probiotiques potentielles à la fois pour la capacité d'immunomodulation et leur capacité à restaurer la barrière intestinale, à deux modèles de colite *in vivo* pourraient être cruciales pour mieux sélectionner les souches à potentiel thérapeutique prometteur. Il reste donc logique d'explorer l'efficacité thérapeutique des souches sélectionnées, capables d'atténuer l'inflammation et de renforcer la barrière intestinale, notamment grâce à la restauration des jonctions serrées, dans des essais cliniques.

**Tableau Supplémentaire S1: Capacité des souches à dégrader l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

<b>Conditions</b>	<b>% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 %
<i>B. bifidum</i> IPL A7.31 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	118.1 % ± 10.1
<i>B. infantis</i> IPL A7.32 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	98.1 % ± 5.1
<i>B. longum</i> IPL A7.33 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	102.1 % ± 7.2
<i>B. longum</i> CMUL CLX 001 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	110.5 % ± 3.5
<i>B. bifidum</i> CMUL CLX 002 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	109.5 % ± 2.3
<i>B. longum</i> CMUL CLX 003 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	98.8 % ± 2.8
<i>L. gasseri</i> IPL A6.62 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	107.0 % ± 4.9
<i>L. gasseri</i> IPL A6.33 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	96.7 % ± 0.8
<i>L. rhamnosus</i> IPL A2.21 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	93.6 % ± 0.8
<i>L. gasseri</i> CMUL057 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	105.0 % ± 1.5
<i>L. acidophilus</i> CMUL067 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	99.8 % ± 3
<i>Staphylococcus aureus</i> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	65.8 % ± 0.7

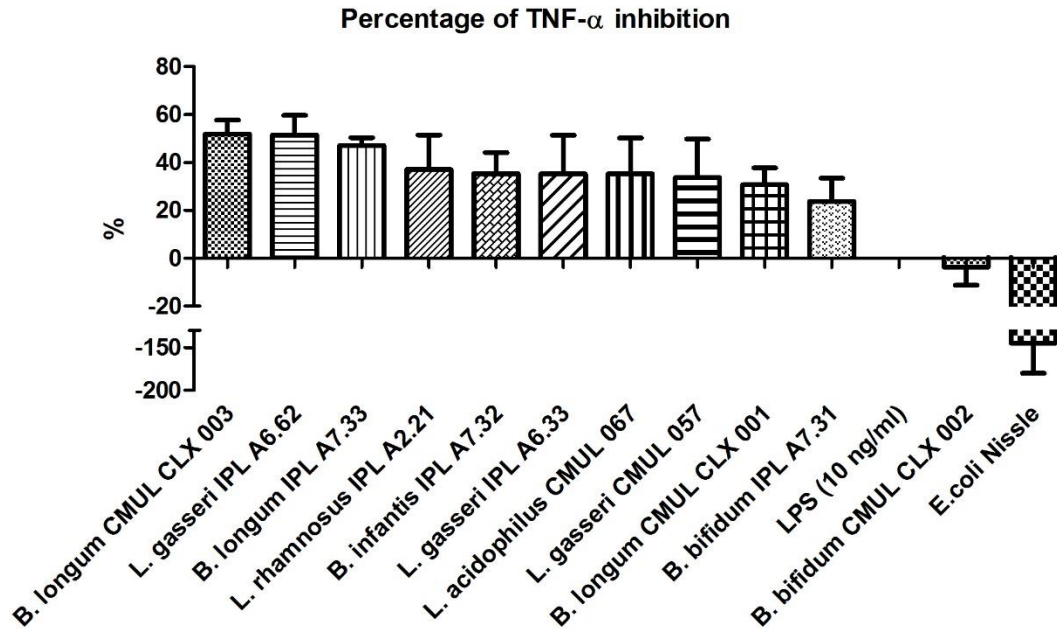
## Résultats complémentaires à l'article 1

Pour poursuivre l'étude des capacités immuno-modulatrices des souches, nous avons stimulé *in vitro* des cellules épithéliales (lignée de cellules épithéliales de colon humain HT-29) par les souches, afin d'évaluer leur capacité à inhiber la production d'IL-8 induite par un stimulus pro-inflammatoire (co-stimulation en présence d'IL-1 $\beta$ ). La majorité des souches ont été capables d'inhiber la production d'IL-8 induite par de l'IL-1 $\beta$ , mais avec un niveau d'inhibition souche-dépendant (Figure 7). La souche *E. coli* Nissle a à l'inverse, conduit à l'augmentation de la production d'IL-8.



**Figure 7:** Pourcentage d'inhibition de la production de l'IL-8 induite par stimulation *in vitro* de cellules HT-29 par de l'IL-1 $\beta$  (2.5 ng/ml) après co-culture avec les souches probiotiques.

Le même profil d'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  après stimulation *in vitro* de macrophages dérivés de la lignée monocyttaire humaine THP-1 stimulés par du LPS a été observé en présence des souche probiotiques (Figure 8). D'autre part, les souches *E. coli* Nissle et *B. bifidum* CMUL CXL 002 peuvent augmenter la production de TNF- $\alpha$ .



**Figure 8:** Pourcentage d'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  induite par stimulation *in vitro* de de macrophages d'rivés de la lignée monocyttaire humaine THP-1 par du LPS (10 ng / ml) après co-culture avec les souches probiotiques.

### Conclusion

Ces travaux complémentaires montrent que la majorité des souches sont capables d'inhiber la production de facteurs pro-inflammatoires induits par un stimulus inflammatoire. Néanmoins, ces tests semblent moins discriminants que les profils de cytokines observés après stimulation de PBMCs. Comme déjà rapporté dans la littérature, les effets ne sont pas totalement superposables (Kechaou et al., 2013).

## **Article 2 : Le blocage de l'autophagie abolit *in vitro* les capacités anti-inflammatoires des souches potentiellement probiotiques et limite *in vivo* leur effet protecteur contre une colite chez la souris.**

Mazen Zaylaa, Jeanne Alard, Imad Al Kassaa, Veronique Peucelle, Denise Boutillier, Jérémy Desramaut, Fouad Dabboussi, Bruno Pot et Corinne Granette

En préparation pour soumission à Cellular Physiology and Biochemistry (cf annexe 1)

### **Introduction**

Les MICI sont caractérisées par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale qui fait suite à de nombreuses perturbations, incluant une perte de l'intégrité de la barrière intestinale, une dysbiose du microbiote notamment une prolifération de bactéries pro-inflammatoires, et une perte de tolérance vis-à-vis de ce microbiote chez des sujets génétiquement susceptibles. Des polymorphismes dans les gènes impliqués dans la cascade autophagique ont notamment été mis en évidence, en particulier chez les patients atteints de maladie de Crohn (MC). L'autophagie est un mécanisme de régulation cellulaire impliqué dans de nombreuses fonctions et qui a été montré récemment comme crucial dans le contrôle de l'homéostasie intestinale. Ce processus joue un rôle important dans la dégradation de pathogènes intracellulaires, par le mécanisme de xénophagie. Il peut également réguler la fonction des cellules de Paneth et donc la production de peptides antimicrobiens importants pour le contrôle du microbiote. Enfin ce mécanisme semble impliquer fortement dans la régulation des réponses immunes, en régulant négativement l'inflammasome permettant de limiter l'exacerbation des réponses inflammatoires et en jouant un rôle dans la présentation d'antigènes et la maturation des cellules dendritiques et la balance de la réponse lymphocytaire T. Ceci a orienté la communauté scientifique à développer des stratégies visant à restaurer ces fonctions. Dans ce contexte, l'utilisation de probiotiques pouvant améliorer les dysbioses du microbiote et l'intégrité de la barrière intestinale associée à des capacités potentiellement anti-inflammatoires sont proposées comme une alternative intéressante du fait de leur innocuité.

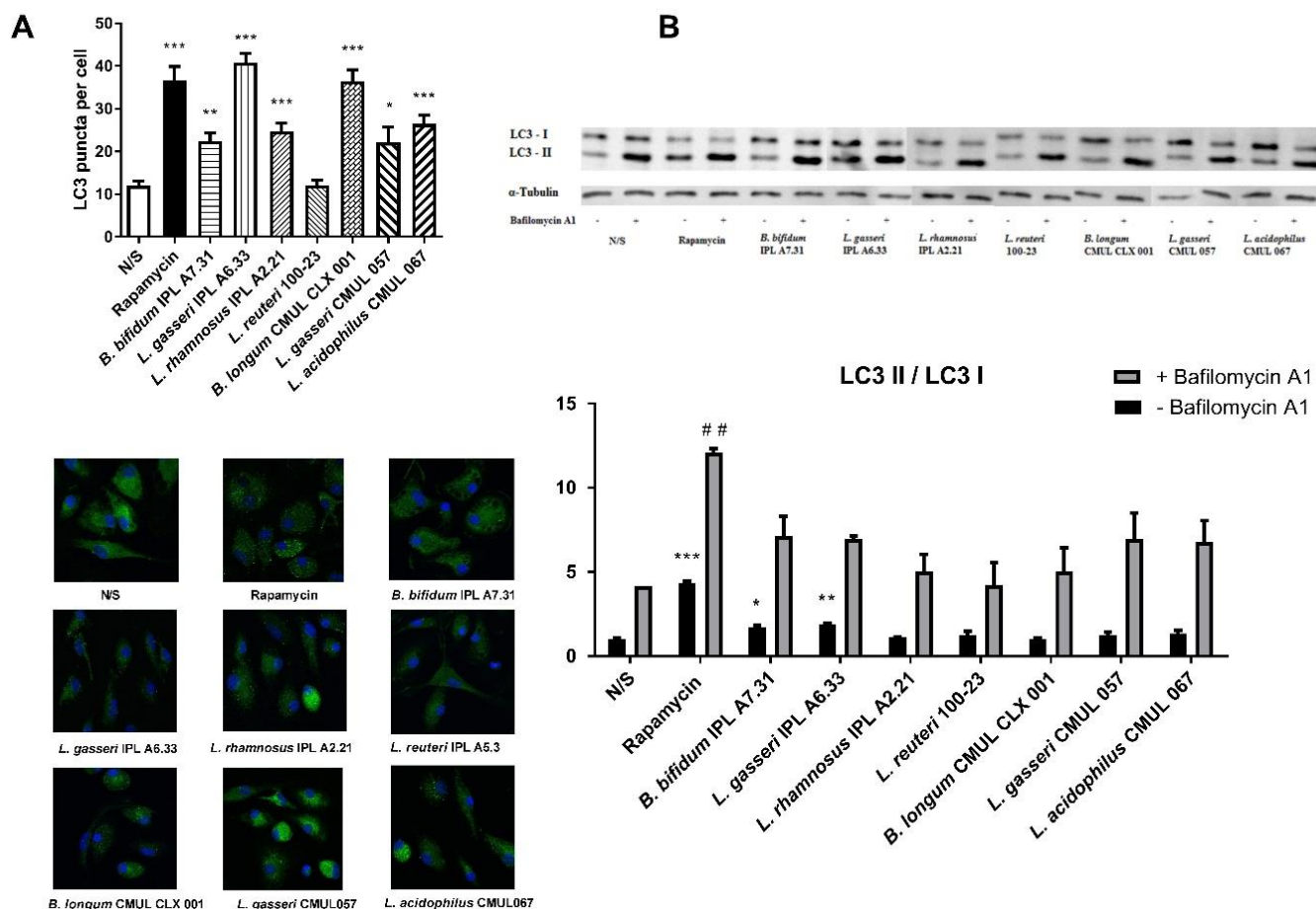
Dans ce contexte, au cours de cette étude, nous avons évalué à la fois *in vitro* et *in vivo* le rôle de l'autophagie dans les capacités immuno-régulatrices de souches potentiellement probiotiques, évalués précédemment lors de notre étude.

## Résultats

### Les souches bactériennes activent l'autophagie dans des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris (BMDC)

Nous avons tout d'abord évalué la capacité des souches bactériennes à activer le processus d'autophagie à l'aide de cellules dendritiques murines. Les BMDC de souris BALB/c ont été stimulées avec les bactéries à un rapport bactéries / cellules de 10 : 1 pendant 4 heures et l'induction de l'autophagie a été suivie par immuno-marquage et analyse par microscopie confocale permettant de déterminer le nombre d'autophagosomes sous forme de Puncta marqué par LC3.

Comme le montre la Figure 1A, les cellules traitées par de la rapamycine pendant 4 heures présente un nombre de punctas marqués par LC3 significativement augmenté ( $p < 0,001$ ) par rapport aux cellules non traitées. Toutes les souches ont été capables d'induire de façons significative la formation d'autophagosomes, mais l'activation a été plus forte après stimulation par les souches *L. gasseri* IPL A6.33 et *B. longum* CMUL CXL 001 ( $p < 0,001$ ), tandis que la souche *L. reuteri* 100-23 semble la plus faible inductrice ( $p = 0.432$ ). Cela a été confirmé en suivant le rapport de LC3-II/ LC3-I après analyse par Western blot. Comme le montre la Figure 1B, une augmentation significative de l'expression de la protéine LC3-II et une augmentation du rapport LC3-II / LC3-I ont été observées dans les cellules traitées par la rapamycine, un activateur de l'autophagie, par rapport au niveau basal observé pour les cellules non traitées ( $p < 0,01$ ). Nous avons également observé une légère activation avec les souches, significative pour *B. bifidum* IPL A7.31 et *L. gasseri* IPL A6.33 ( $p < 0,05$ ). L'activation a été clairement augmentée lorsque les cellules ont été prétraitées avec de la bafilomycine. Ce dernier bloque la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, confirmant la capacité des souches probiotiques à activer l'autophagie.



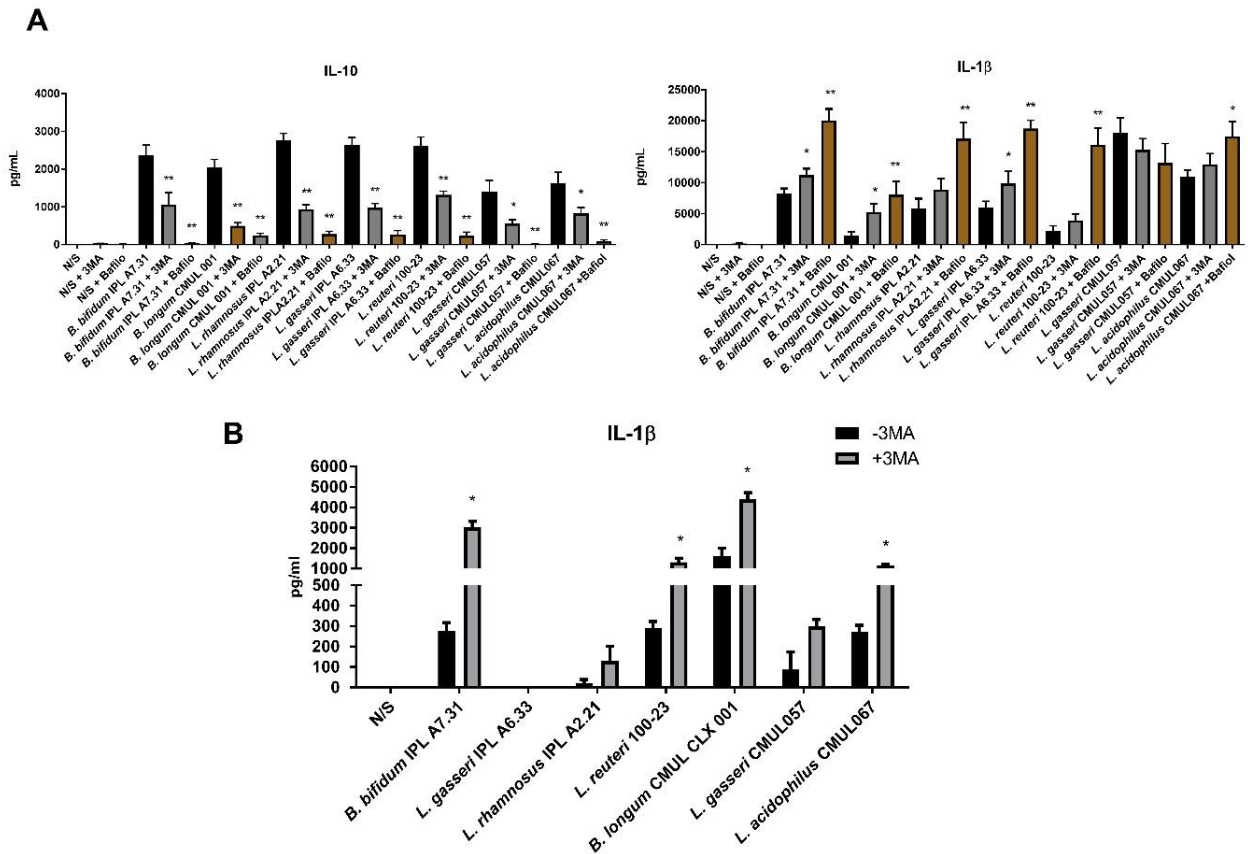
**Fig. 1. Les souches bactériennes induisent l'autophagie dans des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris.**

Les BMDC ont été prétraitées ou non avec de la bafilomycine A1 (100 nM) pendant 1 heure puis stimulées avec les bactéries à un rapport bactéries / cellules de 10 : 1 ou avec de la rapamycine (10 µg / ml) pendant 4 heures. L'autophagie a été suivie par (A) immuno-marquage LC3 et analyse par microscopie confocale à balayage laser et détermination du nombre d'autophagosomes sous forme de puncta marqué par la LC3. Les données représentent la moyenne ± SEM. \* se réfère à la comparaison du groupe traité par les bactéries et du groupe témoin non traité; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. (B) Mesure du rapport LC3-II / LC3-I, après analyse par Western blot. Les données représentent la moyenne ± SEM. \* et # se réfèrent respectivement à la comparaison entre les groupes traités par les bactéries et le groupe témoin non traité (N / S) en l'absence ou en présence de bafilomycine; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* ou ### p < 0,001.



## **L'inhibition de l'autophagie augmente la production d'IL-1 $\beta$ et diminue la sécrétion d'IL-10 dans les cellules immunitaires humaines et les BMDC murines stimulées par des bactéries *in vitro*.**

Nous avons précédemment observé que les bactéries lactiques (LAB) ont des effets immunomodulateurs souche-spécifiques évalués par stimulation de PBMC, corrélés à leur capacité de protection dans un modèle murin de colite (Foligné et al., 2007a). Nous avons par exemple, mis en évidence précédemment la forte capacité anti-inflammatoire de la souche *L. rhamnosus* IPL A2.21 (Zaylaa et al., 2018). Afin d'évaluer le rôle de l'autophagie dans les capacités d'immuno-modulation de ces bactéries, nous avons utilisé deux inhibiteurs pharmacologiques différents: le 3-MA, un inhibiteur de PI3K qui bloque la formation des autophagosomes (Petiot et al., 2000) et la bafilomycine A1, un inhibiteur de la pompe à proton bloquant l'activité lysosomale, qui bloque de ce fait le flux autophagique en empêchant l'acidification des endosomes et des lysosomes (Yamamoto et al., 1998). Les PBMC ont été prétraitées (ou non) avec les inhibiteurs pendant 1 heure et ensuite stimulées par les différentes souches pendant 20 heures et la libération de cytokines a été mesurée. Toutes les souches testées ont induit des niveaux élevés d'IL-10 (Figure 2A), *L. rhamnosus* IPL A2.21, *L. gasseri* IPL A6.33 et *L. reuteri* 100-23 étant les plus forts inducteurs, et *L. gasseri* CMUL057 et *L. acidophilus* CMUL067 les plus faibles, comme précédemment observé (Zaylaa et al., 2018). La capacité des souches à induire de l'IL-1 $\beta$  a été dépendante des souches et inversement corrélée à leur capacité respective à induire de l'IL-10, *L. gasseri* CMUL057 et *L. acidophilus* CMUL067 étant les inducteurs les plus élevés. Les deux inhibiteurs de l'autophagie ont permis de limiter significativement ( $p < 0,05$  ou  $0,01$ ) la production d'IL-10 induite par toutes les souches, avec un effet de la bafilomycine plus prononcé, qui a bloqué complètement l'induction d'IL-10. Inversement, la production d'IL-1 $\beta$  induite par les souches bactériennes a été significativement augmentée lorsque les PBMC ont été prétraitées avec les deux inhibiteurs, l'effet étant également plus important avec la bafilomycine et en particulier pour les souches induisant des taux basaux d'IL-1 $\beta$  modérés ( $p < 0,05$  ou  $0,01$ ). Le rôle de l'autophagie dans les capacités immuno-modulatrices des souches bactériennes a également été confirmé par l'utilisation de BMDC murines. Étant donné qu'une faible quantité d'IL-10 était obtenue après stimulation bactérienne, il n'a pas été possible de mettre en évidence un effet en présence d'inhibiteurs (données non présentées), cependant, le blocage de l'autophagie par la 3-MA, a conduit à une augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par les souches potentiellement probiotiques, comme déjà observés avec les PBMC (Figure 2B).



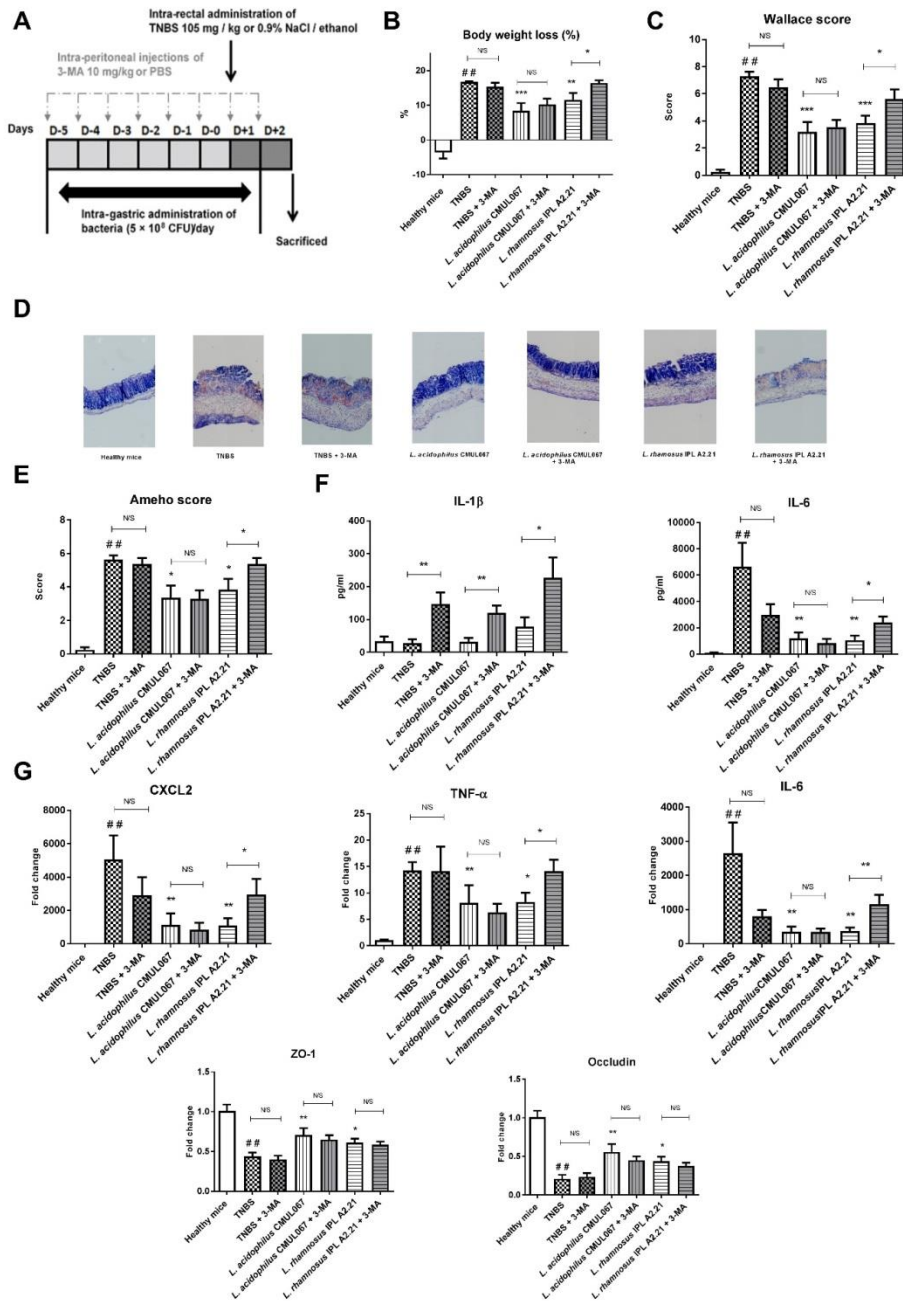
**Fig. 2. Le blocage de l'autophagie augmente la production d'IL-1 $\beta$  alors qu'il diminue la sécrétion d'IL-10 par les cellules immunitaires humaines et les BMDC stimulées par les bactéries.**

(A) Les PBMCs ( $2 \times 10^6$  cellules / ml,  $n = 5$  donneurs différents) ont été prétraitées ou non pendant 1 heure à  $37^\circ\text{C}$  par de la 3-MA (5 mM) ou de la bafilomycine (100 nM), puis ont été stimulées par les différentes souches pendant 20 heures. La production d'IL-10 et d'IL-1 $\beta$  a été mesurée dans les surnageants. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 5 donneurs indépendants. \* fait référence à la comparaison des PBMC stimulées par les bactéries en présence ou absence d'inhibiteurs ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . (B) Les BMDC ( $0,75 \times 10^6$  cellules / puits) ont été prétraitées ou non pendant 1 heure à  $37^\circ\text{C}$  avec de la 3-MA (5 mM) puis stimulées par les différentes souches. La libération d'IL-1 $\beta$  a été mesurée dans les surnageants. Les données représentent des moyennes  $\pm$  SEM de 3 expériences différentes. \*  $p < 0,05$  se réfère à la comparaison des BMDC stimulées par les bactéries en présence ou absence de 3-MA.

## L'inhibition de l'autophagie *in vivo* limite les effets protecteurs de certaines souches dans un modèle murin de colite aiguë induit par le TNBS

Bien que l'impact d'une déficience d'activation de l'autophagie soit bien documenté dans des modèles de colite, il existe un manque de connaissance sur l'importance du maintien de l'activation de l'autophagie dans la pathologie. Nous avons donc évalué le rôle du processus autophagique dans la capacité de protection de certaines souches probiotiques. Un modèle bien établi de colite aiguë, induit par le TNBS (Figure 3A) chez des souris BALB/c a été utilisé.

Deux souches, *L. rhamnosus* A2.21 et *L. acidophilus* CMUL067, ont été sélectionnées sur la base de leur activité protectrice, précédemment mise en évidence comme étant respectivement médiée par une activité anti-inflammatoire ou un renforcement de la barrière épithéliale (Zaylaa et al., 2018). Les bactéries ont été administrées quotidiennement par gavage oral et le blocage de l'autophagie a été réalisé par injection intrapéritonéale (IP) de 3-MA, de façon concomitante à l'administration des bactéries. Comme attendu, le TNBS a entraîné une forte inflammation, caractérisée par une perte de poids moyen de 16.7 % (Figure 3B), des scores d'inflammation macroscopiques (score de Wallace de 7.3,  $p < 0,01$ ), et histologiques (score Ameho de 5.6,  $p < 0,01$ ) très significatifs et une forte augmentation de la concentration en IL-6 plasmatique ( $p < 0,01$ ) (Figure 3B-F), par rapport aux animaux témoins non traités. Ceci a été confirmé par une forte expression colique des gènes pro-inflammatoires codant l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et CXCL2 ( $p < 0,01$ ), 48 heures après l'induction de la colite (Figure 3G), comparativement aux souris témoins non traitées. Les deux souches sélectionnées ont été capables d'atténuer la colite aiguë, entraînant une diminution significative de la perte de poids et des scores d'inflammation macroscopiques ( $p < 0,001$ ) et histologiques ( $p < 0,05$ ) (Figure 3B, C et E), comparativement aux souris ayant reçu uniquement du tampon de gavage (groupe témoin TNBS). La capacité de protection des souches a été confirmée par une diminution significative du taux d'IL-6 plasmatique ( $p < 0,01$ ) et de l'expression de gènes pro-inflammatoires ( $p < 0,05$  ou  $0,01$ ) (Figure 3F-G). Chez les souris n'ayant reçu que le TNBS et la souche *L. acidophilus* CMUL067, l'administration de 3-MA n'a pas réduit de manière significative la perte de poids corporel, les scores macroscopiques et histologiques de l'inflammation ou la concentration plasmatique d'IL-6 (Figure 3B, C et E), alors qu'il a significativement ( $p < 0,05$  ou  $0,01$ ) limité les effets protecteurs induits par la souche *L. rhamnosus* A2.21 pour tous les paramètres testés. Cette observation suggère que le blocage du processus d'autophagie empêche les effets anti-inflammatoires induits par la souche *L. rhamnosus*. Fait intéressant, l'injection quotidienne de 3-MA a entraîné une augmentation du taux d'IL-1 $\beta$  plasmatique dans tous les groupes de souris, même chez les animaux ayant reçu cette souche protectrice (Figure 3F). Alors que le traitement par le TNBS induisait une diminution significative de l'expression de *zo1* et *occludin* ( $p < 0,01$ ) chez les souris témoins, l'administration de souches sélectionnées a pu restaurer de manière significative l'expression des gènes codant pour ces protéines de jonctions serrées. Comparativement avec les souris traitées avec le TNBS, un niveau d'expression plus élevé a été obtenu avec *L. acidophilus* CMUL067, comme déjà rapporté précédemment (Zaylaa et al., 2018). L'administration de 3-MA n'a pas affecté significativement la capacité des souches à induire l'expression de gènes de jonctions serrées.



**Fig. 3. L'inhibition de l'autophagie *in vivo* limite l'effet protecteur de *L. rhamnosus* IPL A2.21 dans le modèle de colite aiguë induite par du TNBS.**

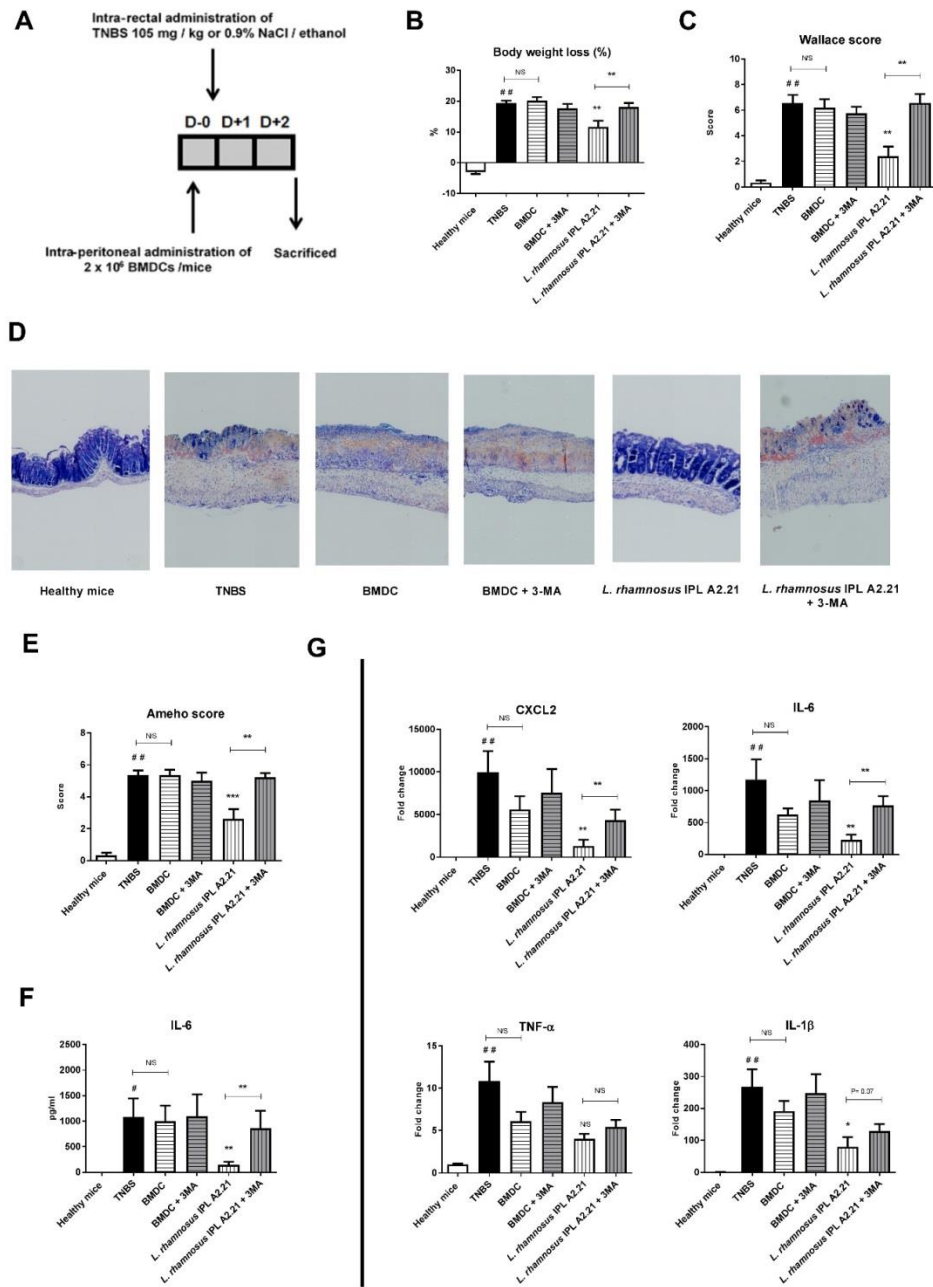
Protocole expérimental utilisé pour le modèle murin de colite aiguë induite par l'administration intrarectale de TNBS (105 mg / kg), l'administration intragastrique des bactéries et l'injection IP de 3-MA.

(B) Perte de poids corporel (en pourcentage du poids initial) (C) Évaluation macroscopique de l'inflammation colique (score de Wallace) (D) coupes histologiques (colorées en May Grünwald Giemsa, grossissement 100X) représentatives de souris traitées (TNBS) ou non (souris saines) avec le TNBS, et traitées ou non par voie orale avec les souches sélectionnées et ayant reçu ou non une injection IP de 3-MA (E) Évaluation histologique de l'inflammation colique (score d'Ameho) (F) Taux plasmatiques d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  évalués par ELISA deux jours après l'induction de la colite (G) Expression génique de *cxcl2*, *il6*, *tnfa*, *zo1* et *occludin* à partir d'échantillons de colon. Les valeurs sont exprimées en niveaux d'ARNm relatifs des échantillons comparés aux colons de souris saines. Les données représentent les valeurs moyennes de chaque groupe (n = 10)  $\pm$  SEM. \* et # font référence respectivement à la comparaison des groupes traités avec les bactéries versus le groupe témoin TNBS ou du groupe TNBS versus le groupe de souris saines; \* p < 0,05, \*\* ou ## p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

## **Le rôle protecteur des BMDCs traitées par les souches bactériennes est aboli après inhibition pharmacologique de l'autophagie**

Nous avons précédemment démontré que le transfert adoptif de BMDC pulsées *in vitro* avec certains lactobacilles était capable de protéger *in vivo* les souris d'une colite (Foligné et al., 2007b). Dans la présente étude, nous avons confirmé qu'une seule administration IP de BMDCs pulsées avec *L. rhamnosus* IPL A2.21 a protégé les souris de la colite induite par le TNBS, alors que les DCs non traitées n'ont eu aucun effet. La capacité de protection des BMDC traitées par les bactéries a été caractérisée par une réduction significative de la perte de poids ( $p < 0,01$ ), des scores d'inflammation macroscopiques et histologiques (respectivement  $p < 0,01$  et  $0,001$ ) et une diminution importante et significative de la sécrétion d'IL-6 plasmatique ( $p < 0,01$ ), alors que ces paramètres n'étaient pas significativement modifiés chez les souris ayant reçu des BMDC non traitées (Figure 4B-E). Cela a été confirmé par la mesure de l'expression des gènes inflammatoires *il6* et *cxcl2* (Figure 4G).

Nous avons donc évalué le rôle de l'autophagie dans les capacités immuno-régulatrices des DC traitées par *L. rhamnosus* IPL A2.21 en stimulant les BMDC avec les bactéries en présence ou en l'absence de 3-MA avant le transfert adoptif. Les DC pulsées par la souche *L. rhamnosus* IPL A2.21, en présence de 3-MA n'étaient plus en mesure de protéger les souris de la colite. La perte de poids corporel, les scores d'inflammation macroscopiques et histologiques, les taux plasmatiques d'IL-6 et l'expression de gènes pro-inflammatoires n'étaient pas significativement différents de ceux obtenus pour les groupes témoin traités par le TNBS ou recevant les BMDC traitées seulement par de la 3-MA (Figure 4B-G).



**Fig. 4. Le rôle protecteur du transfert adoptif de BMDCs traitées avec *L. rhamnosus* est aboli après inhibition pharmacologique de l'autophagie.**

(A) Protocole expérimental utilisé pour le modèle murin de colite aiguë induit par l'administration intrarectale de TNBS (105 mg / kg) et du transfert adoptif de BMDC (B) Perte de poids corporel (en pourcentage du poids initial) (C) Évaluation macroscopique de l'inflammation colique (score de Wallace) (D) Évaluation histologique de l'inflammation colique (score d'Ameho) (E) coupes histologiques (colorées par May Grünwald Giemsa, grossissement 100X) représentatives de souris traitées (TNBS) ou non (souris saines) avec du TNBS et ayant reçu ou non par voie IP des BMDC traitées ou non par la souche *L. rhamnosus* IPL A2.21 en présence ou absence de 3-MA (F) concentrations plasmatiques d'IL-6 mesurées deux jours après l'induction de la colite par ELISA (G) Expression génique de *cxcl2*, *il6*, *tnfa* et *il1b* à partir d'échantillons de colon. Les valeurs sont exprimées en niveaux d'ARNm relatifs des échantillons comparés aux colons de souris saines. Les données représentent les valeurs moyennes de chaque groupe (n = 10)  $\pm$  SEM. \* et # font référence respectivement à la comparaison des groupes traités avec les BMDCs versus le groupe témoin TNBS ou le groupe TNBS versus les souris saines, \* p < 0,05, \*\* ou ## p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

## Discussion

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des pathologies présentant un déséquilibre immunitaire d'étiologie mal connue, caractérisées par une perturbation de la fonction de la barrière épithéliale et par une inflammation chronique de la muqueuse (Maloy and Powrie, 2011). De nombreux facteurs jouent un rôle dans la pathogenèse, notamment l'alimentation, les susceptibilités génétiques, les facteurs immunologiques et environnementaux, incluant le microbiote intestinal. Les études d'association pangénomique (GWAS) ont révélé de nombreux polymorphismes, apportant des preuves croissantes que le processus d'autophagie est défectueux dans les MICI et impliqué dans leur pathogenèse, en particulier chez les patients atteints de MC. Un défaut d'autophagie a été observé dans les parties endommagées des muqueuses de patients et au niveau de la muqueuse de souris traitées par du TNBS (Ortiz-Masiá et al., 2014).

Malgré des avancées significatives, les traitements actuels des MICI restent inefficaces et ciblent principalement les réponses immunitaires pathologiques plutôt que les facteurs potentiellement en cause. Compte tenu de l'intérêt croissant du rôle de l'autophagie dans la régulation de l'homéostasie intestinale, ce processus est devenu une cible attractive pour explorer l'impact d'approches thérapeutiques le ciblant. Des résultats prometteurs ont été obtenus par l'administration de sirolimus (rapamycine), conduisant à une amélioration durable des symptômes chez des patients réfractaires souffrant de MC, avec notamment une réduction de l'inflammation et une amélioration de l'aspect endoscopique (Massey et al., 2008). Il a également été démontré que la stimulation de l'autophagie à l'aide de différents agents pharmacologiques tels que la rapamycine, la bétanine ou le tréhalose prévient les défauts de flux autophagique induit par le TNBS et améliore la colite chez les souris par une inhibition de l'inflammation (Macias-Ceja et al., 2017). Cependant, les traitements actuels sont souvent associés à des effets secondaires indésirables. En conséquence, la recherche se concentre désormais sur des thérapies alternatives, de préférence à base de produits naturels et sûrs. La capacité des probiotiques à améliorer la santé intestinale a suscité un intérêt scientifique considérable depuis plus d'un siècle et les preuves accumulées récemment ont confirmé leur impact positif dans la lutte contre l'inflammation intestinale. Les probiotiques peuvent présenter leurs effets protecteurs grâce à de nombreux mécanismes différents, notamment la modulation du microbiote intestinal, l'amélioration de la fonction de la barrière intestinale et la modulation du système immunitaire muqueux, empêchant les agents pathogènes de pénétrer au travers de la muqueuse intestinale. Dans la présente étude, nous avons évalué l'hypothèse que l'activation de l'autophagie puisse être impliquée dans les capacités anti-inflammatoires de certains lactobacilles et bifidobactéries, précédemment démontrés protecteurs dans un

modèle murin de colite induit par le TNBS (Zaylaa et al., 2018).

### **Sélection des souches**

La détection par microscopie confocale des punctas marqués par LC3 nous a permis de démontrer que les sept souches sélectionnées sont capables d'activer l'autophagie, mise à part une souche de *L. reuteri*. Cela a été confirmé par Western Blot, en suivant la conversion de LC3I à LC3II, notamment après l'utilisation de bafilomycine qui bloque la fusion entre autophagosomes et lysosomes, qui nous a permis de confirmer clairement l'activation de l'autophagie, une plus grande accumulation d'autophagosomes marqués par LC3 étant observée. Peu d'études ont jusqu'ici évalué la capacité des probiotiques ou des bactéries commensales à activer l'autophagie. Lin *et al.* ont rapporté que quatre souches différentes de bifidobactéries ont été capables d'activer l'autophagie dans la lignée cellulaire épithéliale de rat IEC-18 (Lin et al., 2014). Cependant, ils n'ont pas corrélé cette capacité à des propriétés fonctionnelles. Un lysat bioactif dérivé d'une souche de *L. fermentum* a également été montré *in vitro* capable d'activer l'autophagie dans la lignée hépatocytaire humaine HepG2, qui a été corrélé à un effet protecteur contre une toxicité induite par une drogue (Dinić et al., 2017). L'activation de l'autophagie a été également décrit pour *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 dans la lignée cellulaire de macrophages murins RAW264.7 et elle a été montré être impliquée dans l'activité antibactérienne du probiotique favorisant l'élimination d'une souche d'*E. coli* (Wu et al., 2017). Inversement, il a été montré que la souche *L. rhamnosus* GG inhibe l'autophagie induite par *Salmonella enterica* sérovar infantis, diminue ainsi la mort des cellules épithéliales intestinales et limite la translocation de *Salmonella* chez des porcs prétraités par la souche LGG (W. Zhang et al., 2017). De la même manière, le surnageant d'une souche de *B. bifidum* a inhibé l'autophagie induite par du LPS dans les cellules épithéliales intestinales IEC-18 atténuant les lésions cellulaires (Han et al., 2016). Toutes ces données peuvent indiquer que le processus d'autophagie induit par les probiotiques peut être différent selon les souches utilisées, les cellules hôtes ciblées ou les différentes situations physiopathologiques, mais semblent néanmoins intéressantes pour proposer l'autophagie comme nouveau mécanisme par lequel les probiotiques seraient capables de promouvoir et maintenir l'homéostasie intestinale.

### **Le rôle de l'autophagie dans les capacités régulatrices des probiotiques**

L'autophagie apparaît comme l'un des mécanismes effecteurs critiques de l'homéostasie immunitaire intestinale, influençant la présentation de l'antigène par les DCs (Cooney et al., 2010), l'inhibition de la signalisation de l'IL-1 $\beta$  (Lee et al., 2012), la régulation de l'inflammation (Harris et al., 2011; Saitoh et al., 2008; Saitoh and Akira, 2016) et la fonction des cellules de Paneth (Cadwell et al., 2008), entre autres mécanismes (Deretic and Levine,



2009). Nous avons donc évalué le rôle de l'autophagie dans les capacités anti-inflammatoires de nos souches. Nous avons montré que le blocage de la voie autophagique à l'aide de 3-MA ou de bafilomycine, respectivement diminue ou annule la libération de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par les PBMC stimulées par les différents lactobacilles et bifidobactéries. Inversement, le blocage de l'autophagie entraîne une augmentation importante de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , notamment pour les souches ayant induit des taux faibles ou modérés de cette cytokine pro-inflammatoire (*B. bifidum* IPL A7.31, *B. longum* CMUL CXL 001, *L. rhamnosus* IPL A2.21, *L. gasseri* IPL A6.33 et *L. reuteri* 100-23). De la même façon, l'effet a été plus prononcé avec la bafilomycine. Un effet similaire a également été observé en utilisant des BMDC. Saitoh *et al.* ont rapporté pour la première fois que la production *in vitro* d'IL-1 $\beta$  induite par du LPS était augmentée dans des macrophages murins déficients en Atg16L1, par une voie dépendante de l'inflammasome. Les taux de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 étaient également significativement élevés dans les sérums des souris déficientes en Atg16L1 après traitement par du DSS comparativement aux taux observés dans les souris sauvages (Saitoh *et al.*, 2008). Les auteurs ont confirmé, suite à l'administration de 3-MA, que le blocage de l'autophagie augmente les taux d'IL-1 $\beta$  dans le sérum et aggrave le taux de survie des souris traitées par du DSS, suggérant que l'autophagie protège les souris d'une inflammation massive au cours de la colite. Cela a été confirmé dans des PBMC humains, en montrant que l'inhibition de l'autophagie augmente la production d'IL-1 $\beta$  après stimulation des récepteurs de type toll like (TLR2 ou TLR4, néanmoins par une voie indépendante de l'inflammasome (Crişan *et al.*, 2011).

### **Rôle potentiel sur la régulation de l'inflammasome**

Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques cytosoliques impliqués dans la libération de cytokines inflammatoires après détection des agents pathogènes invasifs. L'activation des récepteurs d'immunité innée (PRR), tels que les récepteurs de type Nod, déclenche l'assemblage des complexes de l'inflammasome, ce qui conduit au recrutement de la protéine ASC (Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD). Celle-ci induit l'activation de la caspase-1 impliquée dans le clivage des précurseurs inactifs de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18. La maturation ultérieure de ces cytokines pro-inflammatoires sur les sites d'infection ou de lésion entraîne alors diverses réponses physiologiques, dont le recrutement de cellules pro-inflammatoires. Parmi les complexes de l'inflammasome, celui lié à NLRP3 est le plus largement caractérisé, étant considéré comme une voie de signalisation cruciale pour le contrôle de la maturation de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18. Une régulation fine de l'activation de l'inflammasome et de l'induction des cytokines de la famille IL-1 est donc essentielle pour maintenir l'homéostasie immunitaire et permet de répondre de manière appropriée aux stimuli pathogènes tout en évitant une inflammation chronique incontrôlée. Un nombre croissant de données indique que des défauts de

l'autophagie entraînent une activation aberrante de l'inflammasome, conduisant au développement de maladies inflammatoires. Les mécanismes précis restent à élucider mais peuvent impliquer des dysfonctionnements mitochondriaux et la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables d'activer l'inflammasome (Nakahira et al., 2011), ainsi qu'une diminution du ciblage de l'IL-1 $\beta$  pour la dégradation lysosomiale dans les cellules déficientes en autophagie, conduisant ainsi à une augmentation de sa sécrétion (Dupont et al., 2011; Harris et al., 2011). Les souris déficientes en ATG16L1 présentent une anomalie des cellules de Paneth contenant un plus faible nombre de granules et donc de défensines antibactériennes, alors qu'elle présentent une production accrue d'IL-1 $\beta$  (Cadwell et al., 2008).

### ***Impact de l'autophagie dans les effets protecteurs des souches in vivo***

Pour mieux aborder le rôle de l'autophagie dans les capacités anti-inflammatoires de certaines souches, nous avons évalué *in vivo* dans le modèle murin de colite induite par le TNBS, l'impact du blocage de l'autophagie par l'injection quotidienne de 3-MA par voie intra-péritonéale (IP) en même temps que l'administration orale de deux souches de lactobacilles. Nous avons sélectionné la souche *L. rhamnosus* A2.21 précédemment montrée comme étant protectrice par l'induction d'une réponse immunitaire régulatrice associée à la capacité de restaurer la barrière épithéliale et la souche *L. acidophilus* CMUL067, qui a induit un effet protecteur essentiellement lié à un important renforcement de la barrière épithéliale et à la restauration des protéines de jonctions serrées (Zaylaa et al., 2018). Comme attendu, les deux souches ont pu limiter la colite induite par le TNBS, avec une réduction significative des scores d'inflammation macroscopiques et histologiques, des taux plasmatiques d'IL-6 et de l'expression colique de gènes codant pour les marqueurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6 et CXCL2. Les effets protecteurs de la souche *L. rhamnosus* A2.21 ont été significativement inhibés après un traitement par de la 3-MA. Comme déjà décrit pour des stimulations pharmacologiques de l'autophagie (Macias-Ceja et al., 2017), nous avons pu conclure que la souche de *L. rhamnosus* A2.21 a pu réduire l'inflammation intestinale par un mécanisme impliquant l'autophagie, bien que d'autres mécanismes ne puissent être exclus. De plus, une augmentation considérable du taux plasmatique d'IL-1 $\beta$  a été observée chez les souris ayant reçu le 3-MA, indiquant une perte de contrôle de l'inflammasome après le blocage du mécanisme d'autophagie, comme déjà décrit dans la littérature (Macias-Ceja et al., 2017; Saitoh and Akira, 2016). Fait intéressant, le blocage de l'autophagie n'a pas affecté la capacité de protection de la souche *L. acidophilus* CMUL067. Cela suggère que l'autophagie est impliquée dans les capacités immunorégulatrices des lactobacilles, mais pas dans leurs capacités de protection liées au renforcement des

fonctions de la barrière intestinale. L'autophagie épithéliale a été impliquée dans le renforcement de la barrière au cours de l'infection par *Salmonella*. En effet, un défaut d'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales (IEC) a conduit à une augmentation de la dissémination bactérienne et de l'inflammation (Benjamin et al., 2013; Conway et al., 2013). Par l'utilisation de souris présentant des déficiences en Atg161 spécifiques des tissus, Pott *et al.* ont démontré que l'autophagie au niveau de l'épithélium intestinal, mais pas des cellules myéloïdes, est impliquée dans le maintien de l'intégrité de la barrière et qu'elle limite l'inflammation dans un modèle de colite chronique (Pott et al., 2018). L'autophagie épithéliale pourrait également être un mécanisme de réponse au dysfonctionnement de la barrière muqueuse dans les pancréatites aiguës sévères, en prévenant et en réduisant le stress oxydatif. Un rôle de l'autophagie spécifique en fonction du type cellulaire a été rapporté dans le contexte de l'homéostasie des muqueuses. Une altération de la fonction autophagique dans les IEC a été principalement reliée au dysfonctionnement des cellules de Paneth (Adolph et al., 2013). Au niveau des cellules myéloïdes, l'autophagie est impliquée dans la régulation de la réponse cytokinique pro-inflammatoire, en particulier la sécrétion de cytokines dépendantes de l'inflammasome et des taux de ROS (Lassen et al., 2014; Saitoh and Akira, 2016). Des études récentes ont également révélé que l'autophagie est nécessaire à la survie et à la fonction des lymphocytes T régulateurs, importants pour maintenir l'homéostasie intestinale (Kabat et al., 2016). Plusieurs types de cellules, notamment les cellules épithéliales et les cellules hématopoïétiques, interagissent avec les bactéries commensales et peuvent initier des fonctions différentes et complémentaires dans l'intestin. Nous avons précédemment observé que certains lactobacilles activent partiellement les BMDC, induisant des DCs régulatrices capables de conférer, après un transfert adoptif, une protection contre la colite induite par le TNBS, de manière NOD2-dépendante (Foligné et al., 2007b; Macho Fernandez et al., 2011). Étant donné que les DCs, qui sont les plus puissantes cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, jouent un rôle essentiel dans l'initiation et le maintien de l'homéostasie et de la tolérance immunitaire, nous avons étudié l'impact de l'autophagie sur leur fonction. Comme nous l'avons observé précédemment pour une souche de *L. salivarius*, le transfert adoptif de BMDCs pulsées *in vitro* avec la souche *L. rhamnosus* A2.21 a permis de conférer une protection chez les souris traitées par du TNBS, alors que les DCs non traitées n'avaient aucun effet. Lorsque les DCs ont été stimulées par les bactéries en présence de l'inhibiteur de l'autophagie 3-MA, elles n'étaient plus en mesure de protéger les souris de la colite. Cela indique que l'autophagie est impliquée dans la capacité de la souche à induire des DCs régulatrices et que ce processus cellulaire est important pour que les DCs exercent leur fonction au niveau intestinal. Il a été démontré que l'autophagie est impliquée dans les fonctions des DC à plusieurs niveaux: présentation de l'antigène, production de cytokines, migration et maturation et activation des cellules T. L'autophagie a notamment été associée

à un rôle positif dans la maturation des DCs vers un profil tolérogène (Ghislat and Lawrence, 2018). La déficience spécifique de l'autophagie dans des DCs CD11c<sup>+</sup> a exacerbé la colite induite par du DSS chez la souris, corrélée à une induction accrue des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ . Cette déficience en Atg16l1 a entraîné une augmentation de la production de ROS et a été proposée comme nouvelle voie protectrice au cours de l'inflammation intestinale (Zhang et al., 2017a). En utilisant la co-culture DC-IEC sur des inserts de type transwell, il a également été démontré que le blocage de l'autophagie, par l'utilisation de siRNA, entraîne des interactions DC-IEC anormales (Strisciuglio et al., 2013).

## **Conclusion**

Compte tenu de l'interaction complexe qui existe entre l'hôte et le microbiote intestinal, il est maintenant reconnu que l'autophagie peut agir à différents niveaux. Notre étude a révélé pour la première fois que cette machinerie cellulaire est impliquée dans les capacités anti-inflammatoires de certaines souches potentiellement probiotiques et en particulier dans leur capacité à induire des réponses immunitaires, notamment des DCs régulatrices. Même s'il reste important d'approfondir les mécanismes impliqués, nous pouvons conclure que l'autophagie est un nouveau mécanisme par lequel les probiotiques peuvent exercer leurs activités bénéfiques dans les MICI.

## Résultats complémentaires à l'article 2

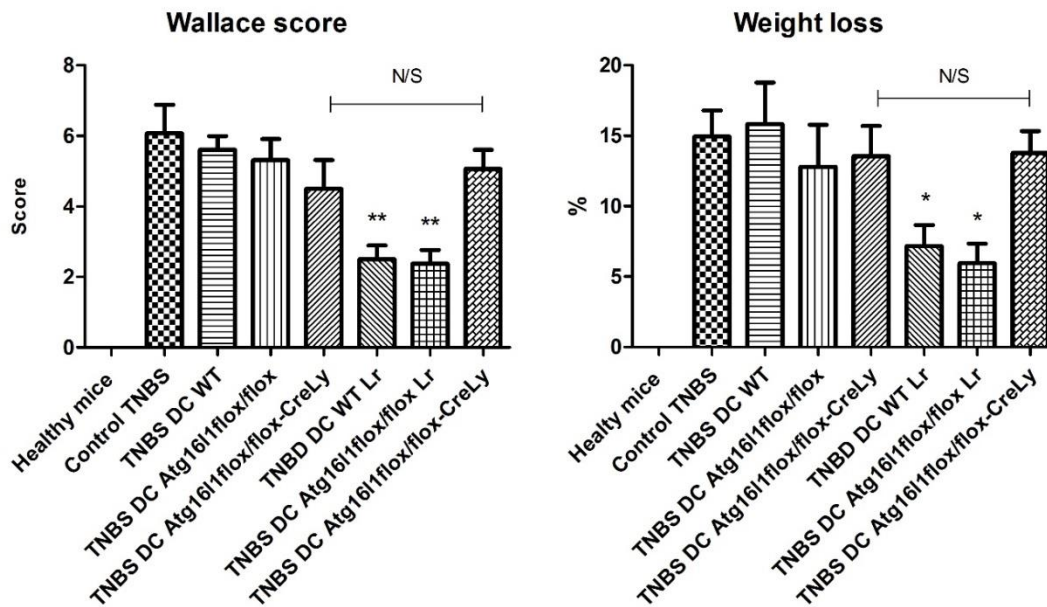
### Introduction

Nous avons observé que le transfert adoptif de BMDCs préalablement sensibilisées *in vitro* par la souche *L. rhamnosus* A2.21 était capable de protéger les souris d'une colite induite par du TNBS et que le traitement des cellules avec du 3-MA abolissait ces effets protecteurs.

Pour confirmer ces observations, nous avons eu l'opportunité d'obtenir très récemment de la moelle osseuse de souris déficientes pour l'ATG16L1 (souris atg16l1 flox/flox-CreLys) qui présente une délétion spécifique d'ATG16L1 au niveau des cellules myéloïdes, fournies par le Dr Hang Nguyen (Inserm U1071, INRA USC 2018, Université Clermont Auvergne) en collaboration avec le Pr Rosentiel (UKSH University, Kiel, Allemagne), ainsi que des souris contrôle atg16l1 flox/flox, présentant un phénotype sauvage. Ces souris étant dans le « background » C57BL/6, nous avons fait des optimisations chez les souris C57BL/6 pour induire une colite de même niveau que celle réalisée chez les souris BALB/c, et nous avons ainsi déterminé qu'une dose de TNBS de 150mg/kg était nécessaire pour induire une colite significative, comme le laboratoire l'avait déjà observé (Macho Fernandez et al., 2011).

### Résultats

Comme le montre la Figure 5, le traitement de souris par le TNBS (150 mg/kg) induit une forte colite chez les souris C57BL/6, conduisant à une perte de poids de 14.93 % et un score de Wallace de  $6,07 \pm 0,81$  ( $p < 0.001$ ). Les souris ayant reçu les DCs dérivées de souris sauvages, de souris contrôle ou de souris déficientes, non sensibilisées par les bactéries, ne montrent pas de différence significative par rapport au groupe contrôle traité par le TNBS. Par contre, comme obtenu dans le modèle de souris BALB/c, le transfert adoptif de BMDCs sauvages et contrôle (atg16l1 flox/flox) préalablement sensibilisées par la souche *L. rhamnosus* A2.21 a conduit à une protection significative ( $p < 0,01$ ), ce qui n'a pu être observé après transfert de BMDCs dérivées de souris déficientes pour l'ATG16L1 (souris atg16l1 flox/flox-CreLys) traitées par la souche.



**Figure 5 : Le rôle protecteur du transfert adoptif de BMDCs traitées avec *L. rhamnosus* A2.21 est aboli lorsque les DCs sont dérivées de souris déficientes pour l'ATG16L1**

Impact du transfert adoptif de BMDCs dérivées de souris sauvages (DC WT), de souris contrôle (DC atg16l1 flox/flox) et de souris déficientes (souris atg16l1 flox/flox-CreLys), préalablement traitées ou non par la souche *L. rhamnosus* A2.21 (Lr) à protéger les souris d'une colite au TNBS. Les souris ont reçu par injection intrapéritonéale les BMDCs ( $2 \times 10^6$  cellules/ souris) 2h avant l'induction de la colite par administration intrarectale de TNBS (150 mg/kg) à des souris C57BL/6. (A) Perte de poids (pourcentage par rapport au poids initial), (B) score macroscopique d'inflammation (score de Wallace).

L'analyse des échantillons est en cours, pour notamment confirmer l'impact du transfert de BMDCs sur la réponse inflammatoire (par qPCR et histologie) et la modulation de l'inflammation systémique (dosage d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$ ), ce qui permettra également d'évaluer un impact sur l'inflammasome. Nous envisageons d'aller plus loin sur les mécanismes impliqués en analysant différents paramètres par western blot sur les segments de colon. Nous regarderons notamment la conversion de la protéine LC3, l'impact sur la modulation des protéines p62 et becline 10 impliquées dans la cascade autophagique.

## Conclusion

Ces travaux confirment que des bactéries sélectionnées sont capables d'induire des DCs régulatrices capables de protéger les souris d'une colite expérimentale après transfert adoptif et que cette capacité protectrice est perdue lorsque les cellules sont déficientes pour dans leur polarisation vers des DCs de type régulateur.

# Résultats préliminaires obtenus au Liban

## Introduction

Nous avons observé au cours de notre étude, que le blocage de l'autophagie inhibe ou abolit la capacité des souches potentiellement probiotiques à induire de l'IL-10 et à l'inverse exacerbe leur capacité à induire de l'IL-1 $\beta$ . Nous avons donc envisagé d'effectuer une étude *ex vivo* à en utilisant des cellules mononuclées isolées de patients atteints de maladie de Crohn (MC) ou de sujets sains contrôle afin d'évaluer si l'induction d'IL-10 par les souches probiotiques est également perturbée chez les patients portant des polymorphismes pour les gènes d'autophagie *atg16l1*, *il23r* et *irgm* et également pour le gène *nod2*. Cette étude a pu être initiée au Liban

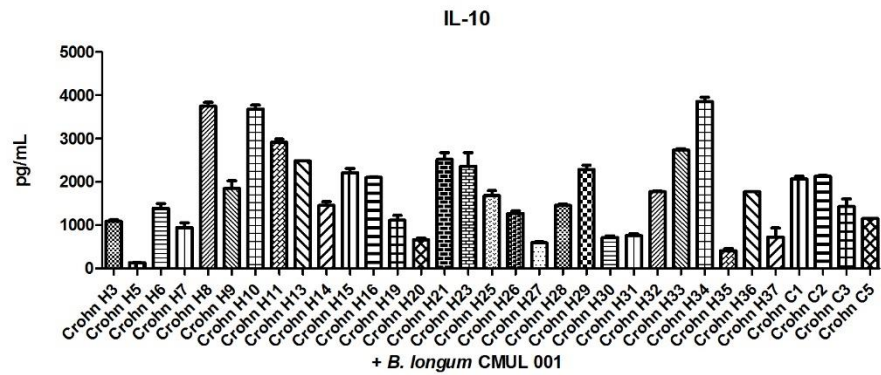
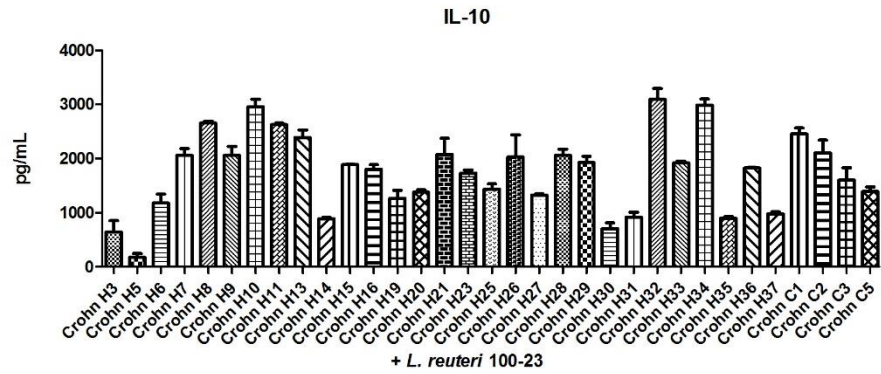
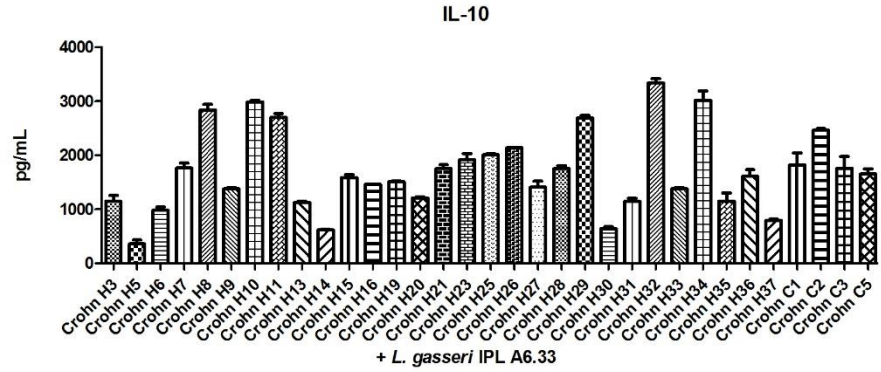
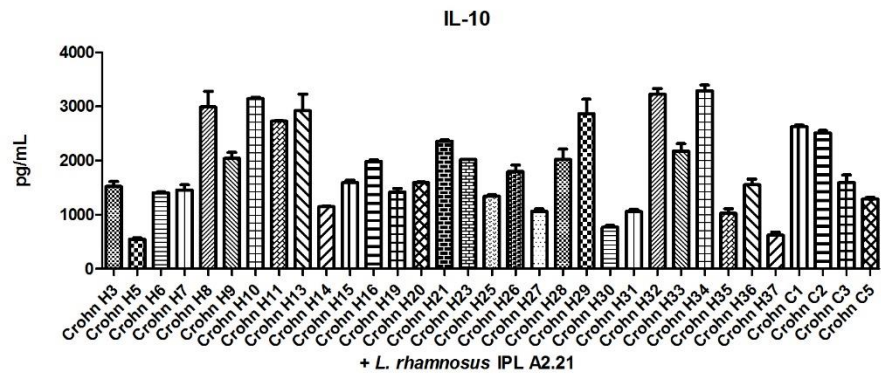
## Etude expérimentale

L'étude a porté sur 40 sujets atteints de MC ainsi que 40 sujets contrôle (donneurs sains) qui ont été recrutés à l'hôpital Nini et Monla (Tripoli). Une prise de sang a été effectuée et les PBMC ont été isolées comme décrit précédemment. Les cellules ont été stimulées au cours de deux expériences, par quatre souches (*L. rhamnosus* A2.21 ; *L. gasseri* A6.33 ; *L. reuteri* 100-23 et *B. longum* CMUL CXL 001) précédemment montrées comme anti-inflammatoires (Zaylaa et al., 2018). La production d'IL-10 et d'IL-1 $\beta$  après un contact de 24 heures a été évaluée par ELISA.

## Résultats

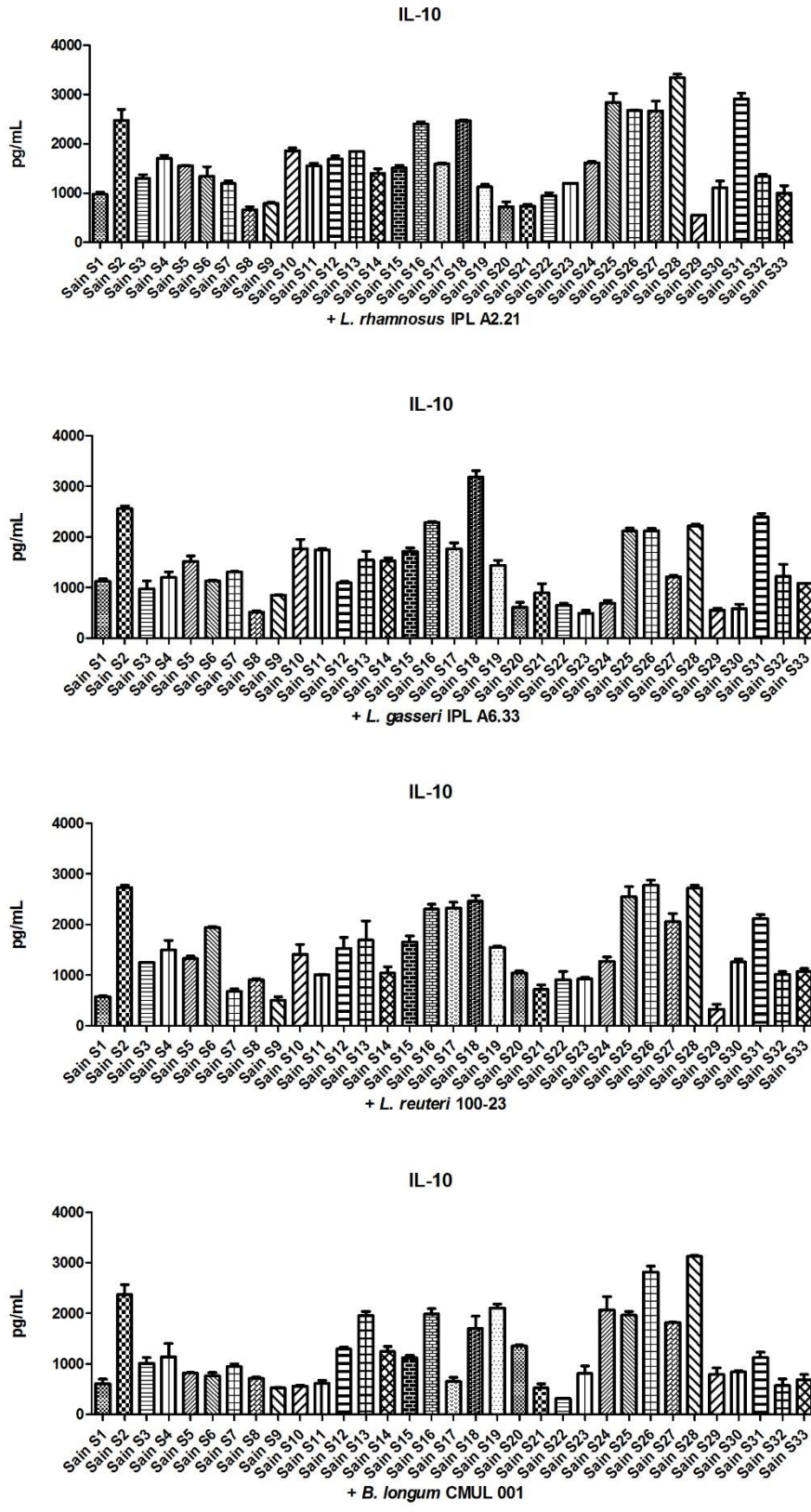
Comme le montre la Figure 6, les taux d'IL-10 observés à partir des PBMCs de patients MC sont variables en fonction des souches et des donneurs, comme nous l'observons chez les sujets sains (Figure 7). Le dosage de l'IL-1 $\beta$  est en cours ainsi que l'étude des polymorphismes génétiques pour les gènes *nod2*, *atg16l1*, *il23r* et *irgm* en utilisant la technique de Pyrosequencing (Pyromark ID, Qiagen-Germany) au sein du laboratoire LMSE.

Nous étudierons alors si nous pouvons corréliser les profils d'induction d'IL-10 et inversement d'IL-1 $\beta$  par les souches probiotiques en fonction des mutations.



**Figure 6 : Profils d'induction d'IL-10 après stimulation *in vitro* de PBMC de patients MC.** La production de cytokines a été évaluée dans les surnageants de PBMC (donneurs MC) après 24 de stimulation par les 4 souches testées





**Figure 7 : Profils d'induction d'IL-10 après stimulation *in vitro* de PBMC de sujets sains.** La production de cytokines a été évaluée dans les surnageants de PBMC (donneurs sains) après 24 de stimulation par les 4 souches testées

# ***DISCUSSION GENERALE***

Les MICIs sont des pathologies qui touchent une population importante au niveau mondial. Ce sont des maladies multifactorielles, ce qui rend la stratégie thérapeutique très complexe (Maloy and Powrie, 2011). Plusieurs études ont montré récemment que la perturbation de l'homéostasie intestinale est l'un des facteurs les plus importants impliqués dans le développement des MICI (Singh et al., 2013). Cette homéostasie dépend de la régulation entre les différentes composantes de la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale et d'une interaction étroite avec le microbiote intestinal. Les MICI étant associées à une perturbation de ces fonctions et une dysbiose du microbiote, l'utilisation de probiotiques a été proposée comme alternative intéressante pour améliorer l'état de santé des patients souffrant de MICI et diminuer les symptômes de la pathologie (Saez-Lara et al., 2015). Les probiotiques ont montré une certaine efficacité chez les patients souffrant de RCH, ce qui n'a pas été le cas pour ceux atteints de MC (Saez-Lara et al., 2015). Ces résultats ouvrent donc de grandes questions sur la sélection des souches probiotiques, leurs mécanismes d'action ainsi que le rôle des facteurs génétiques des patients.

### **Sélection de souches**

Les probiotiques peuvent exercer leurs effets bénéfiques dans les MICI par différents mécanismes. Leur capacités anti-inflammatoires, leur capacité à restaurer la barrière intestinale ainsi que la stimulation des cellules de Paneth à produire des peptides antimicrobiens sont les effets les plus intéressants des probiotiques, du fait que ces composantes sont affectées dans ce type de pathologie. Dans ce contexte, nous avons criblé à l'aide de modèles *in vitro* une collection de souches libanaises et françaises et avons pu sélectionner 5 souches présentant un bon profil anti-inflammatoire (évalué par la stimulation de PBMC) ainsi qu'une très bonne capacité à restaurer la barrière intestinale (évaluée par un modèle de monocouche de cellules épithéliales sensibilisée par du peroxyde d'oxygène). La souche *L. acidophilus* CMUL067 est la seule souche qui n'a pas présenté un profil anti-inflammatoire mais qui par contre a montré une forte capacité à restaurer la barrière épithéliale. La souche *L. rhamnosus* IPL A2.21 a quant à elle présenté la double capacité à restaurer la barrière épithéliale tout en présentant un très bon profil anti-inflammatoire. Nous avons confirmé *in vivo* en utilisant deux modèles différents de colite aigüe et de bas grade (respectivement TNBS et DSS), que la souche *L. rhamnosus* IPL A2.21 est capable de protéger les souris et que la protection s'accompagne non seulement d'une excellente capacité anti-inflammatoire mais également de l'induction d'une réponse de type régulatrice. De façon intéressante, la souche *L. acidophilus* CMUL067 a conduit au meilleur effet protecteur dans les deux modèles de colite, passant notamment par la meilleure capacité à limiter la perméabilité intestinale dans le modèle au DSS, confirmant les résultats observés *in vitro*. Ces résultats ont donc montré que l'effet protecteur d'une souche probiotique contre l'inflammation peut dépendre non seulement de ses capacités anti-

inflammatoires mais aussi de sa capacité à renforcer la barrière intestinale, permettant une restauration de l'homéostasie intestinale. Par conséquent, le choix et la sélection des souches probiotiques dans un but thérapeutique doit prendre en considération les mécanismes d'action de la souche en fonction de la pathologie ciblée, comme par exemple, la capacité à restaurer la barrière intestinale dans le cas des MICI.

De nombreuses études cliniques ont évalué l'impact de la consommation de différentes souches probiotiques sur l'amélioration de la maladie de Crohn (MC). Quatorze études cliniques ont été réalisées en utilisant des souches probiotiques déjà commercialisées telle que la souche *L. rhamnosus* GG et d'autres souches ayant un mécanisme d'action inconnu (Ghouri et al., 2014). La majorité de ces études cliniques ont échoué, les probiotiques étant plus ou moins inactifs. Ces résultats sont problématiques, puisque certaines souches avaient présenté de bonne capacité anti-inflammatoire dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

### **Rôle de l'autophagie**

Dans le cas de la MC, de nombreux facteurs génétiques semblent jouer un rôle crucial et impactent fortement sur la régulation des réponses immunes et le contrôle des réponses anti-microbiennes. La majorité des patients présentent en effet des polymorphismes touchant des gènes impliqués dans de nombreuses voies qui ont le potentiel d'influencer l'homéostasie intestinale, comme par exemple des gènes impliqués dans l'immunité innée, tel que le gène codant le récepteur NOD2, mais également des gènes impliqués dans les processus d'autophagie tels que *atg16l1* et *irgm* (Cooney and Jewell, 2009; Hampe et al., 2007; Hugot et al., 2001; J. Z. Liu et al., 2015). L'équipe a montré dans un modèle murin de colite, que l'effet protecteur d'un lactobacille est NOD2-dépendant (Macho Fernandez et al., 2011), impliquant notamment le rôle crucial de la paroi de cette bactérie. Ceci peut donc expliquer pourquoi certaines souches sont inefficaces chez les patients atteints de MC, le gène NOD2 étant le gène majeur de susceptibilité de la MC. Plusieurs études récentes ont montré que l'autophagie est un processus crucial pour maintenir l'homéostasie intestinale et limiter l'inflammation lors d'une infection intestinale, notamment par la régulation de l'inflammasome (Saitoh and Akira, 2016). Dans ce contexte, nous avons poursuivi le criblage de nos souches en évaluant leur capacité à activer l'autophagie et le rôle de ce processus dans leurs capacités anti-inflammatoires. Nous avons pu montrer *in vitro* que la majorité des souches sont capables d'activer cette voie de régulation cellulaire et que cette voie semble être impliquée dans leurs propriétés régulatrices, notamment dans l'induction de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. A l'inverse le blocage de l'autophagie conduit à une exacerbation de leur capacité à induire de l'IL-1 $\beta$ , suggérant que les souches peuvent réguler l'inflammasome via l'autophagie. Il serait à ce niveau très important d'aller plus loin dans les mécanismes d'action et de décortiquer toutes les cascades de signalisation

impliquées, tant au niveau de l'autophagie que de la régulation de l'inflammasome. Puisque le processus autophagique diminue l'activation de l'inflammasome dans des conditions physiologiques, il serait intéressant d'analyser plus finement l'activité de l'inflammasome en particulier liée à NLRP3, en évaluant l'activation de la caspase-1 après stimulation des cellules par de la 3-MA et de bafilomycine ou en utilisant des BMDCs dérivées de souris KO. De plus, il serait important de doser la production d'IL-18.

Nous avons poursuivi cette étude *in vivo* dans le modèle de colite au TNBS, et montré que les capacités protectrices de la souche *L. rhamnosus* A2.21 sont significativement inhibées après l'administration de 3-MA, un inhibiteur de la PI3K qui bloque la formation des autophagosomes (Petiot et al., 2000), alors que ce blocage n'a aucun impact sur les capacités de la souche *L. acidophilus* CMUL067. L'effet protecteur de la souche A2.21 est principalement médié par l'induction de réponse anti-inflammatoire et régulatrice, mise en évidence notamment par une augmentation du facteur de transcription FoxP3, marqueur de l'induction de réponse de type T régulatrice. Ces résultats ont donc indiqué que l'autophagie semble être impliquée préférentiellement dans les capacités immuno-régulatrices des souches, par contre ne semble pas être impliquée dans les capacités des souches à restaurer la barrière intestinale, le blocage n'ayant eu aucun impact sur la souche *L. acidophilus* CMUL067.

### **Mécanismes et cellules potentiellement impliqués**

En conditions physiopathologiques, l'autophagie est impliquée dans la modulation de nombreuses voies de régulation. La xénophagie notamment qui permet la dégradation de bactéries pathogènes au niveau intracellulaire, en particulier de certaines bactéries impliquées dans la physiopathologie de la MC, tels que les *E. coli* AIEC, permet la clairance de ces bactéries (Lapaquette et al., 2010) et évite ainsi la surprolifération de bactéries pro-inflammatoires conduisant à l'exacerbation de l'inflammation et au développement d'une inflammation chronique. L'autophagie est également impliquée dans le contrôle de la sécrétion de peptides anti-microbiens par les cellules de Paneth (Cadwell et al., 2008; Lassen et al., 2014). Notre modèle de colite au TNBS étant un modèle court, il semble peu plausible que le blocage de l'autophagie ait favorisé une amélioration de la dysbiose microbienne, il serait néanmoins intéressant d'analyser l'impact sur le microbiote et d'évaluer le rôle de ce processus dans un modèle de colite plus chronique, telle que celui déjà développé par notre laboratoire (Alard et al., 2018; Burns et al., 2017) qui permet une meilleure analyse de l'induction de réponse de type régulatrice. Par contre, nous avons observé que le blocage de l'autophagie entraîne une augmentation des taux d'IL-1 $\beta$  plasmatique chez les souris ayant reçu l'inhibiteur, d'autant plus marquée chez les souris

traitées par la souche *L. rhamnosus* A2.21, suggérant une dérégulation de l'inflammasome, comme déjà décrit dans la littérature (Saitoh and Akira, 2016). Ceci suggère que la souche *L. rhamnosus* a protégé les souris de la colite par un mécanisme pouvant en outre, impliquer l'autophagie dans les capacités anti-inflammatoires de la souche et dans ses capacités à contrôler l'inflammasome. Comme évoqué précédemment dans le modèle *in vitro*, il serait intéressant de décrypter les différents voies impliquées dans cette régulation et confirmer avec des outils moléculaires les facteurs impliqués. Le rôle de l'autophagie dans la régulation de l'homéostasie intestinale et son impact dans les MICI, a clairement été mis en évidence par des études de polymorphismes génétiques chez l'homme (Hampe et al., 2007) et par l'obtention de souris déficientes pour différents gènes, notamment de l'*atg16l1* (Cadwell et al., 2008; Saitoh et al., 2008; H. Zhang et al., 2017a). Ce n'est que très récemment que la communauté scientifique s'est interrogée sur le(s) type(s) cellulaires(s) mise(s) en jeu. Des délétions spécifiques ont mis en évidence que les souris *atg16l1* KO au niveau des cellules épithéliales intestinales (IECs) présentent des anomalies au niveau des cellules de Paneth (Conway et al., 2013), et sont plus susceptibles aux infections, notamment par *S. typhimurium*, alors que cette délétions au niveau des cellules dendritiques (DCs) n'a aucun impact dans ce modèle. Ceci a suggéré que l'autophagie au niveau des IECs est importante pour la clairance des bactéries. Une autre étude a montré qu'une délétion spécifique d'*atg16l1* dans les IECs pouvait conduire au développement d'une iléite spontanée, indiquant un rôle compensatoire de l'autophagie sur l'inflammation mettant en jeu le stress du reticulum endoplasmique (Adolph et al., 2013). Une délétion conditionnelle dans des macrophages a également montré un défaut de clairance de *Yersinia enterocolitica* (Murthy et al., 2014; Tschurtschenthaler et al., 2017).

### **Impact potentiel de l'autophagie sur les réponses régulatrices**

Chez l'homme, certains patients présentant des polymorphismes spécifiques, notamment le variant ATG16L1 T300A, présentent des défauts dans les capacités de présentation de l'antigène des DCs (Salem et al., 2015). Notre équipe a déjà montré le rôle important des DCs dans les propriétés immuno-régulatrices des lactobacilles, notamment en montrant que le transfert de BMDCs préalablement sensibilisées par les bactéries protège les souris d'une colite au TNBS (Foligné et al., 2007b). Nous avons donc évalué le rôle de l'autophagie dans ce mécanisme en transférant des BMDCs traitées ou non par la souche *L. rhamnosus* A2.21 en présence ou non de 3-MA. Nous avons ainsi pu confirmer que le transfert de DCs traitées par la souche A2.21 conduit à un effet protecteur chez les souris BALB/c, comme déjà observé avec d'autres souches (Foligné et al., 2007b). Ceci confirme que la souche exerce bien ses capacités anti-inflammatoires par un mécanisme impliquant un contrôle de la réponse immune, notamment l'induction de réponse régulatrice. De façon intéressante le blocage de l'autophagie par de la 3-MA a limité significativement les capacités protectrices

des DCs, suggérant que ce mécanisme a une influence sur la polarisation des DCs impliquées dans la réponse anti-inflammatoire de la souche potentiellement probiotique. Nous avons confirmé ces observations en transférant des BMDCs dérivées de souris déficientes pour *atg16l1* et montré que contrairement au transfert de DCs sauvages ou contrôles traitées par la souche A2.21, le transfert de DCs KO préalablement sensibilisées par la souche n'a aucun effet protecteur. Il serait important à ce niveau de vérifier par la purification des cellules de *Lamina propria* l'induction effective de cellules de type Treg. Des travaux très récents ont élucidé le rôle de l'autophagie au niveau de la lignée myéloïde. Des souris déficientes pour *atg16l1* dans la lignée myéloïde et dans les DCs (CD11c<sup>+</sup>) ont été générées (Zhang et al., 2017b). Ces travaux ont montré que la déficience dans la lignée myéloïde présente une exacerbation de la colite, notamment induite par une infection par *S typhimurium* ou par du DSS s'accompagnant d'une augmentation des macrophages pro-inflammatoires, de la production de cytokines pro-inflammatoires et de micro-organismes recouverts d'IgA. Ils ont observé que cela était relié à une augmentation de la production de ROS, des défauts dans la mitophagie et du contrôle anti-microbien, suggérant une fonction altérée des macrophages. Les souris ayant une délétion au niveau des DCs n'ont montré une exacerbation que dans le modèle de colite au DSS, s'accompagnant d'une augmentation de la capacité des DCs à produire de l'IL-1 $\beta$  et une diminution de leur capacité de présentation des antigènes, par contre aucun effet dans le modèle d'infection à *S. typhimurium*. Il est dommage que ces travaux n'aient pas évalué l'impact sur la réponse lymphocytaire, notamment l'induction de Treg (Zhang et al., 2017a). Une étude similaire a également récemment montré le rôle de l'autophagie au niveau des IECs dans le contrôle d'une colite induite par le blocage d'une réponse régulatrice par injection d'anti-IL-10R et d'une co-infection par *Helicobacter hepaticus* chez la souris, alors que la même déficience au niveau des DCs n'avait qu'un rôle marginal dans ce modèle (Pott et al., 2018). Des travaux ont mis en évidence que le blocage de l'autophagie a un impact sur la polarisation de la réponse T dans des modèles de co-culture., limitant notamment la libération d'IL-10 (Strisciuglio et al., 2013). Une délétion de différents gènes d'autophagie dans des BMDCs a montré que ce processus est nécessaire pour l'activation de Tregs impliqué dans le contrôle de l'inflammation par *Bacteroides fragilis* (Chu et al., 2016). Ces travaux indiquent que l'autophagie joue un rôle important dans l'induction de DCs de type tolérogène (Ghislat and Lawrence, 2018). Les mécanismes ne sont pas encore élucidés. Une délétion sélective d'*atg16l1* au niveau des cellules T conduit à l'apparition d'une inflammation intestinale spontanée, caractérisée par une aberration des réponses Th2 aux antigènes microbiens, une perte des cellules Treg FoxP3<sup>+</sup> (Kabat et al., 2016). Une ablation spécifique du gène dans des cellules T FoxP3<sup>+</sup> a démontré que l'autophagie est importante pour promouvoir leur survie et leur adaptation métabolique dans l'intestin. Tous ces travaux démontrent que l'autophagie joue un rôle important dans la balance des différentes populations cellulaires

impliquées dans le contrôle de l'inflammation et le maintien de l'homéostasie intestinale et qu'un défaut dans ce processus, lié notamment aux polymorphismes génétiques, contribue au développement des MICI. Il est donc suggéré que l'activation de l'autophagie par des traitements médicamenteux pourrait influencer la susceptibilité aux MICI. Ceci a pu être mis en évidence dans un modèle de colite induite par du TNBS chez la souris, pour lesquelles différents traitements visant à activer l'autophagie (rapamycine, tréhalose, betanine) ont pu prévenir les défauts d'autophagie et améliorer la colite par une inhibition des réponses inflammatoires, impliquant notamment une diminution de la becline 10 et de la p62. Ceci pourrait s'expliquer par une diminution de la phosphorylation de  $\text{I}\kappa\text{-B}\alpha$  et de la translocation nucléaire de NF- $\kappa\text{B}$ , impliquée dans la cascade inflammatoire (Macias-Ceja et al., 2017). Néanmoins cela pose la question de l'efficacité de tels traitements chez des patients présentant des polymorphismes génétiques dans les gènes de l'autophagie. L'administration de rapamycine (sirolimus), puissant inhibiteur de la voie mTOR et activateur de l'autophagie, a cependant pu améliorer les symptômes chez une patiente ayant une MC réfractaire à tout traitement classique. Néanmoins le statut génétique de la patiente n'a pas été rapporté (Massey et al., 2008).

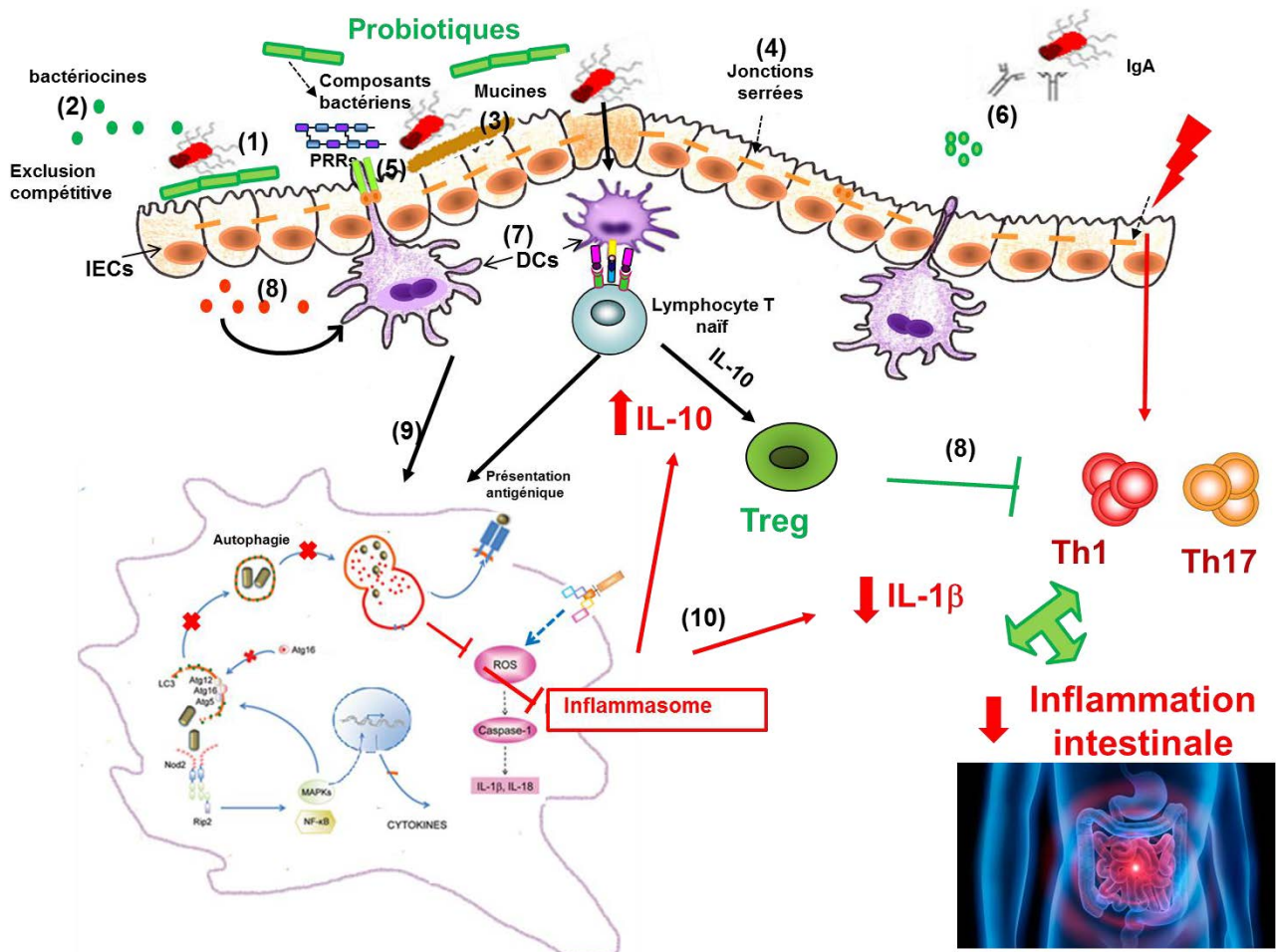
### **Conclusion générale et perspectives**

En conclusion, nos travaux ont montré que le criblage *in vitro* ciblant à la fois le profil anti-inflammatoire de souches potentiellement probiotiques et leur capacité à restaurer la barrière épithéliale, nous a permis de sélectionner des souches prometteuses pour une application dans les MICI. Nous avons également proposé l'autophagie comme nouveau mécanisme impliqué dans leurs capacités immuno-régulatrices (Figure 15). Peu de travaux ont montré jusqu'à présent l'activation de ce processus par des bactéries probiotiques ou commensales et aucun n'avait démontré son rôle fonctionnel *in vivo* et en particulier dans le contrôle des réponses inflammatoires. Nos travaux sont donc pionnier dans ce domaine. Il reste néanmoins beaucoup de questions, notamment il est important de mieux décortiquer les mécanismes mis en jeu. Il serait crucial de pouvoir évaluer l'impact protecteur direct des souches (ou du moins de la souche *L. rhamnosus* A2.21) chez des souris présentant une déficience dans différents populations cellulaires afin d'évaluer si le rôle de l'autophagie se concentre principalement sur le contrôle de la réponse immune par l'induction de DCs régulatrices et de Treg, ou si ce processus peut être impliqué aussi au niveau de l'interaction des bactéries avec la barrière épithéliale. Nous n'avons en effet observé aucun impact sur l'effet protecteur de la souche *L. acidophilus* CMUL067 qui semble protéger via une restauration de la barrière. Il serait donc important de vérifier si *in vivo* un défaut au niveau de la muqueuse peut influencer fortement la réponse bénéfique des



souches. Il a été montré par l'équipe un rôle potentiel de NOD2 dans les capacités immuno-régulatrices des lactobacilles. NOD2 pouvant favoriser le recrutement d'ATG16L1 à la membrane, cette double interaction a été impliquée dans le développement de la MC (Travassos et al., 2010). Il serait donc intéressant d'approfondir aussi ce mécanisme dans nos modèles. Enfin, comme évoqué, il reste important de mieux suivre l'impact au niveau des différentes voies de signalisation, notamment mieux évaluer l'impact sur le contrôle de l'inflammasome.

Des tests PBMC ont été réalisés au Liban au laboratoire LMSE pour évaluer l'impact de la stimulation de cellules provenant de patients atteints de MC et de sujets sains par quatre souches probiotiques ayant un profil anti-inflammatoire sur la production de cytokines. L'analyse de la production d'IL-10 a confirmé un profil souche-spécifique et surtout variable selon les donneurs que ce soit à partir de PBMC issus des patients MC ou de sujets sains. Afin de corrélérer ces taux d'IL-10 au statut génétique des patients, des études de polymorphismes ciblés sur les gènes *nod2*, *atg16l1* ainsi que *irgm* sont en cours. Nous espérons que cette étude *ex vivo* pourra venir étayer le rôle de l'autophagie sur les capacités immuno-régulatrices des probiotiques.



**Figure 15: Schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans les capacités bénéfiques des probiotiques dans le contexte des MICIs**

Les probiotiques peuvent limiter la prolifération et l'invasion des bactéries pathogènes par (1) un mécanisme d'exclusion compétitive, (2) la production de bactériocines, (3) le renforcement de la barrière épithéliale via l'activation de la production de mucines et (4) l'action sur les jonctions serrées. Les probiotiques sont également capables d'influencer la réponse immunitaire en (5) activant les cellules dendritiques via l'interaction de composants bactériens avec les récepteurs de l'Immunité innée (PRR), favorisant (6) l'activation de la production d'anticorps (IgA) capables de bloquer les bactéries pathogènes ou (7) la polarisation de la réponse lymphocytaire T vers une réponse de type Tregulatrice, permettant de (8) contrecarrer les réponses inflammatoires, notamment Th1 et Th17. Notre étude propose également que les probiotiques pourraient agir via l'autophagie (9) sur la régulation de l'inflammasome (10) et ainsi bloquer les réponses de type inflammatoire (IL-1 $\beta$ ) et renforcer l'induction d'IL-10.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

- Abdelouhab, K., Rifa, H., Toumi, R., Bouaziz, S., Medjeber, O., Touil-Boukoffa, C., 2012. Mucosal intestinal alteration in experimental colitis correlates with nitric oxide production by peritoneal macrophages: effect of probiotics and prebiotics. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 34, 590–597. <https://doi.org/10.3109/08923973.2011.641971>
- Abdul-Baki, H., ElHajj, I., El-Zahabi, L.M.N., Azar, C., Aoun, E., Zantout, H., Nasreddine, W., Ayyach, B., Mourad, F.H., Soweid, A., Barada, K.A., Sharara, A.I., 2007. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease in Lebanon. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 475–480. <https://doi.org/10.1002/ibd.20022>
- Abreu, M.T., Fukata, M., Arditi, M., 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 4453–4460.
- Adams, J.B., Johansen, L.J., Powell, L.D., Quig, D., Rubin, R.A., 2011. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* 11, 22. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-22>
- Adcock, I.M., 2004. Corticosteroids: limitations and future prospects for treatment of severe inflammatory disease. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* 1, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2004.11.015>
- Adolph, T.E., Tomczak, M.F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, E., et al., 2013. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* 503, 272–276. <https://doi.org/10.1038/nature12599>
- Agustina, R., Lukito, W., Firmansyah, A., Suhardjo, H.N., Murniati, D., Bindels, J., 2007. The effect of early nutritional supplementation with a mixture of probiotic, prebiotic, fiber and micronutrients in infants with acute diarrhea in Indonesia. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16, 435–442.
- Ahl, D., Liu, H., Schreiber, O., Roos, S., Phillipson, M., Holm, L., 2016. *Lactobacillus reuteri* increases mucus thickness and ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 217, 300–310. <https://doi.org/10.1111/apha.12695>
- Ahmad, R., Sorrell, M.F., Batra, S.K., Dhawan, P., Singh, A.B., 2017. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol.* 10, 307–317. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.128>
- Ahrne, S., Hagslatt, M.-L.J., 2011. Effect of lactobacilli on paracellular permeability in the gut. *Nutrients* 3, 104–117. <https://doi.org/10.3390/nu3010104>
- Akyol, S., Mas, M.R., Comert, B., Ateskan, U., Yasar, M., Aydogan, H., Deveci, S., Akay, C., Mas, N., Yener, N., Kocar, I.H., 2003. The effect of antibiotic and probiotic combination therapy on secondary pancreatic infections and oxidative stress parameters in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 26, 363–367.
- Al Kassaa, I., Hamze, M., Hober, D., Chihib, N.-E., Drider, D., 2014. Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. *Microb. Ecol.* 67, 722–734. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0384-7>

- Alard, J., Lehrter, V., Rhimi, M., Mangin, I., Peucelle, V., Abraham, A.-L., Mariadassou, M., Maguin, E., Waligora-Dupriet, A.-J., Pot, B., Wolowczuk, I., Grangette, C., 2016. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environ. Microbiol.* 18, 1484–1497. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13181>
- Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Breton, J., Kuylle, S., Pot, B., Holowacz, S., Grangette, C., 2018. New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining *in vitro* and *in vivo* approaches. *Benef. Microbes* 9, 317–331. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0097>
- AlFaleh, K., Anabrees, J., 2014. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants [WWW Document]. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005496.pub4>
- Allen, U.D., 2014. Le *Clostridium difficile* dans les populations d'âge pédiatrique. *Paediatr. Child Health* 19, 49–54.
- Aller, R., De Luis, D.A., Izaola, O., Conde, R., Gonzalez Sagrado, M., Primo, D., De La Fuente, B., Gonzalez, J., 2011. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 15, 1090–1095.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M., Ma, T., 2011. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G1054-1064. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00055.2011>
- Alvarez-Olmos, M.I., Oberhelman, R.A., 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 1567–1576. <https://doi.org/10.1086/320518>
- Ameho, C.K., Adjei, A.A., Harrison, E.K., Takeshita, K., Morioka, T., Arakaki, Y., Ito, E., Suzuki, I., Kulkarni, A.D., Kawajiri, A., Yamamoto, S., 1997. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* 41, 487–493.
- Amre, D.K., D'Souza, S., Morgan, K., Seidman, G., Lambrette, P., Grimard, G., Israel, D., Mack, D., Ghadirian, P., Deslandres, C., Chotard, V., Budai, B., Law, L., Levy, E., Seidman, E.G., 2007. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am. J. Gastroenterol.* 102, 2016–2025. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01411.x>
- Amu, S., Saunders, S.P., Kronenberg, M., Mangan, N.E., Atzberger, A., Fallon, P.G., 2010. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1114-1124.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.018>
- Ananthkrishnan, A.N., 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 205–217. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.34>

- Ananthakrishnan, A.N., 2013. Antibiotic exposure is associated with development of inflammatory bowel disease. *J. Pediatr.* 162, 1077. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.02.045>
- Ananthakrishnan, A.N., Higuchi, L.M., Huang, E.S., Khalili, H., Richter, J.M., Fuchs, C.S., Chan, A.T., 2012. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann. Intern. Med.* 156, 350–359. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-5-201203060-00007>
- Ananthakrishnan, A.N., Khalili, H., Konijeti, G.G., Higuchi, L.M., de Silva, P., Fuchs, C.S., Willett, W.C., Richter, J.M., Chan, A.T., 2014. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 63, 776–784. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305304>
- Ananthakrishnan, A.N., Khalili, H., Konijeti, G.G., Higuchi, L.M., de Silva, P., Korzenik, J.R., Fuchs, C.S., Willett, W.C., Richter, J.M., Chan, A.T., 2013. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 145, 970–977. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.050>
- Anderson, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W.C., Park, Z., McCann, M.J., Kelly, W.J., Roy, N.C., 2010. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol.* 10, 316. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-316>
- Arbolea, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., Margolles, A., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Gueimonde, M., 2012. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 763–772. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x>
- Arnott, I.D., Kingstone, K., Ghosh, S., 2000. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 35, 1163–1169.
- Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., Rodríguez, J.M., 2010. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 50, 1551–1558. <https://doi.org/10.1086/652763>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., et al., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Arvola, T., Laiho, K., Torkkeli, S., Mykkänen, H., Salminen, S., Maunula, L., Isolauri, E., 1999. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics* 104, e64.
- Azad, M.A.K., Sarker, M., Li, T., Yin, J., 2018. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed Res. Int.* 2018, 9478630. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R., 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1808–1815.

- Bartlett, J.G., 1996. Management of *Clostridium difficile* infection and other antibiotic-associated diarrhoeas. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 1054–1061.
- Bass, R., Eneli, I., 2015. Severe childhood obesity: an under-recognised and growing health problem. *Postgrad. Med. J.* 91, 639–645. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2014-133033>
- Baumgart, D.C. (Ed.), 2017. *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach*, 2nd ed. Springer International Publishing.
- Baumgart, D.C., Sandborn, W.J., 2012. Crohn's disease. *Lancet Lond. Engl.* 380, 1590–1605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9)
- Baxt, L.A., Xavier, R.J., 2015. Role of Autophagy in the Maintenance of Intestinal Homeostasis. *Gastroenterology* 149, 553–562. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.06.046>
- Benjamin, J.L., Sumpter, R., Levine, B., Hooper, L.V., 2013. Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria. *Cell Host Microbe* 13, 723–734. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.004>
- Bermudez-Brito, M., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Matencio, E., Romero, F., Gil, A., 2015. *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 and its culture supernatant modulate Salmonella-induced inflammation in a novel transwell co-culture of human intestinal-like dendritic and Caco-2 cells. *BMC Microbiol.* 15, 79. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0408-6>
- Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., Bemelman, W.A., Mjösberg, J.M., Spits, H., 2013. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* 14, 221–229. <https://doi.org/10.1038/ni.2534>
- Bernstein, C.N., El-Gabalawy, H., Sargent, M., Landers, C., Rawsthorne, P., Elias, B., Targan, S.R., 2011. Assessing inflammatory bowel disease-associated antibodies in Caucasian and First Nations cohorts. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 25, 269–273.
- Bernstein, C.N., Shanahan, F., 2008. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 57, 1185–1191. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.122143>
- Bernstein, C.N., Wajda, A., Svenson, L.W., MacKenzie, A., Koehoorn, M., Jackson, M., Fedorak, R., Israel, D., Blanchard, J.F., 2006. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1559–1568. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00603.x>
- Beser, O.F., Conde, C.D., Serwas, N.K., Cokugras, F.C., Kutlu, T., Boztug, K., Erkan, T., 2015. Clinical features of interleukin 10 receptor gene mutations in children with very early-onset inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 60, 332–338. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000621>

- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453, 1051–1057. <https://doi.org/10.1038/nature07036>
- Bevins, C.L., Salzman, N.H., 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 356–368. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- Bibiloni, R., Mangold, M., Madsen, K.L., Fedorak, R.N., Tannock, G.W., 2006. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J. Med. Microbiol.* 55, 1141–1149. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46498-0>
- Bienenstock, J., Collins, S., 2010. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: psycho-neuroimmunology and the intestinal microbiota: clinical observations and basic mechanisms. *Clin. Exp. Immunol.* 160, 85–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04124.x>
- Bitton, A., Dobkin, P.L., Edwardes, M.D., Sewitch, M.J., Meddings, J.B., Rawal, S., Cohen, A., Vermeire, S., Dufresne, L., Franchimont, D., Wild, G.E., 2008. Predicting relapse in Crohn's disease: a biopsychosocial model. *Gut* 57, 1386–1392. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.134817>
- Blaabjerg, S., Artzi, D.M., Aabenhus, R., 2017. Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Outpatients-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiot. Basel Switz.* 6. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040021>
- Blair, S.A., Kane, S.V., Clayburgh, D.R., Turner, J.R., 2006. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 86, 191–201. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700373>
- Boman, H.G., 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.000425>
- Bonen, D.K., Cho, J.H., 2003. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124, 521–536. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50045>
- Bourreille, A., Cadiot, G., Le Dreau, G., Laharie, D., Beaugerie, L., Dupas, J.-L., Marteau, P., Rampal, P., Moyse, D., Saleh, A., Le Guern, M.-E., Galmiche, J.-P., FLORABEST Study Group, 2013. *Saccharomyces boulardii* does not prevent relapse of Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 11, 982–987. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.02.021>
- Bousvaros, A., Guandalini, S., Baldassano, R.N., Botelho, C., Evans, J., Ferry, G.D., Goldin, B., Hartigan, L., Kugathasan, S., Levy, J., Murray, K.F., Oliva-Hemker, M., et al., 2005. A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus* GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 11, 833–839.



- Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R.P., Pamer, E.G., 2007. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* 204, 1891–1900. <https://doi.org/10.1084/jem.20070563>
- Brandtzaeg, P., 2007. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25, 5467–5484. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.001>
- Brandtzaeg, P., Johansen, F.-E., 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol. Rev.* 206, 32–63. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x>
- Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J., Cryan, J.F., 2011. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16050–16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Bravo, J.A., Julio-Pieper, M., Forsythe, P., Kunze, W., Dinan, T.G., Bienenstock, J., Cryan, J.F., 2012. Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.09.010>
- Buhner, S., Buning, C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, A., Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt, H.H.-J., Lochs, H., 2006. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 55, 342–347. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.065557>
- Burns, P., Alard, J., Hrdý, J., Boutillier, D., Páez, R., Reinheimer, J., Pot, B., Vinderola, G., Grangette, C., 2017. Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. *Sci. Rep.* 7, 43211. <https://doi.org/10.1038/srep43211>
- Busquets, D., Mas-de-Xaxars, T., López-Siles, M., Martínez-Medina, M., Bahí, A., Sàbat, M., Louvriex, R., Miquel-Cusachs, J.O., Garcia-Gil, J.L., Aldeguer, X., 2015. Anti-tumour Necrosis Factor Treatment with Adalimumab Induces Changes in the Microbiota of Crohn's Disease. *J. Crohns Colitis* 9, 899–906. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv119>
- Butel, M.-J., 2014. Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *J. Anti-Infect.* 16, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.010>
- Cabrera, S., Fernández, A.F., Mariño, G., Aguirre, A., Suárez, M.F., Español, Y., Vega, J.A., Laurà, R., Fueyo, A., Fernández-García, M.S., Freije, J.M.P., Kroemer, G., López-Otín, C., 2013. ATG4B/autophagin-1 regulates intestinal homeostasis and protects mice from experimental colitis. *Autophagy* 9, 1188–1200. <https://doi.org/10.4161/auto.24797>
- Cadieux, P.A., Burton, J., Devillard, E., Reid, G., 2009. *Lactobacillus* by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 60 Suppl 6, 13–18.

- Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., Stone, C.D., Brunt, E.M., Xavier, R.J., Sleckman, B.P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T.S., Virgin, H.W., 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456, 259–263. <https://doi.org/10.1038/nature07416>
- Cadwell, K., Patel, K.K., Komatsu, M., Virgin, H.W., Stappenbeck, T.S., 2009. A common role for Atg16L1, Atg5 and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease. *Autophagy* 5, 250–252.
- Cadwell, K., Patel, K.K., Maloney, N.S., Liu, T.-C., Ng, A.C.Y., Storer, C.E., Head, R.D., Xavier, R., Stappenbeck, T.S., Virgin, H.W., 2010. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* 141, 1135–1145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.009>
- Cámara, R.J.A., Schoepfer, A.M., Pittet, V., Bégré, S., von Känel, R., Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort Study (SIBDCS) Group, 2011. Mood and nonmood components of perceived stress and exacerbation of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2358–2365. <https://doi.org/10.1002/ibd.21623>
- Can, M., Beşirbellioğlu, B.A., Avci, I.Y., Beker, C.M., Pahsa, A., 2006. Prophylactic *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective study. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 12, PI19-22.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091–1103. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>
- Canonico, B., Cesarini, E., Salucci, S., Luchetti, F., Falcieri, E., Di Sario, G., Palma, F., Papa, S., 2016. Defective Autophagy, Mitochondrial Clearance and Lipophagy in Niemann-Pick Type B Lymphocytes. *PloS One* 11, e0165780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165780>
- Cantorna, M.T., Munsick, C., Bemiss, C., Mahon, B.D., 2000. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J. Nutr.* 130, 2648–2652. <https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2648>
- Cantorna, M.T., Zhu, Y., Froicu, M., Wittke, A., 2004. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1717S–20S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1717S>
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M.A., Severi, C., 2015. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann. Gastroenterol. Q. Publ. Hell. Soc. Gastroenterol.* 28, 203–209.

- Cárdenas, N., Laiño, J.E., Delgado, S., Jiménez, E., Juárez del Valle, M., Savoy de Giori, G., Sesma, F., Mayo, B., Fernández, L., LeBlanc, J.G., Rodríguez, J.M., 2015. Relationships between the genome and some phenotypical properties of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4343–4353. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6429-0>
- Cario, E., Gerken, G., Podolsky, D.K., 2004. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 127, 224–238.
- Cazzola, M., Pham-Thi, N., Kerihuel, J.-C., Durand, H., Bohbot, S., 2010. Efficacy of a synbiotic supplementation in the prevention of common winter diseases in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 4, 271–278. <https://doi.org/10.1177/1753465810379010>
- Cerutti, A., 2008. The regulation of IgA class switching. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 421–434. <https://doi.org/10.1038/nri2322>
- Cerutti, A., Rescigno, M., 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28, 740–750. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.001>
- Chandran, P., Satthaporn, S., Robins, A., Eremin, O., 2003. Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (I). *Surg. J. R. Coll. Surg. Edinb. Irel.* 1, 63–75.
- Chapman-Kiddell, C.A., Davies, P.S.W., Gillen, L., Radford-Smith, G.L., 2010. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 137–151. <https://doi.org/10.1002/ibd.20968>
- Chen, X., Fruehauf, J., Goldsmith, J.D., Xu, H., Katchar, K.K., Koon, H.-W., Zhao, D., Kokkotou, E.G., Pothoulakis, C., Kelly, C.P., 2009. *Saccharomyces boulardii* inhibits EGF receptor signaling and intestinal tumor growth in *Apc(min)* mice. *Gastroenterology* 137, 914–923. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.050>
- Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Astals, P., Echevarría, J., Iglesias, J.R., Balbarie, P., Ramón, D., Genovés, S., 2011. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1335–1343. <https://doi.org/10.1128/AEM.01820-10>
- Chermesh, I., Tamir, A., Reshef, R., Chowers, Y., Suissa, A., Katz, D., Gelber, M., Halpern, Z., Bengmark, S., Eliakim, R., 2007. Failure of Synbiotic 2000 to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 52, 385–389. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9549-7>
- Cho, J.H., Brant, S.R., 2011. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140, 1704–1712. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.046>
- Choi, A.M.K., Ryter, S.W., Levine, B., 2013. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 651–662. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205406>

- Choy, M.C., Visvanathan, K., De Cruz, P., 2017. An Overview of the Innate and Adaptive Immune System in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 23, 2–13. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000955>
- Chu, H., Khosravi, A., Kusumawardhani, I.P., Kwon, A.H.K., Vasconcelos, A.C., Cunha, L.D., Mayer, A.E. et al., 2016. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* 352, 1116–1120. <https://doi.org/10.1126/science.aad9948>
- Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S.-P., Castillo, P.A., de Jong, M.F., Winter, M.G., Winter, S.E et al., 2012. Human  $\alpha$ -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* 337, 477–481. <https://doi.org/10.1126/science.1218831>
- Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S., Power, S.E., O'Connor, E.M., Cusack, S., Harris, H.M.B., et al., 2012. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488, 178–184. <https://doi.org/10.1038/nature11319>
- Collins, S.M., 2014. A role for the gut microbiota in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 497–505. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.40>
- Coloretti, F., Carri, S., Armaforte, E., Chiavari, C., Grazia, L., Zambonelli, C., 2007. Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 245–250. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00723.x>
- Conway, K.L., Kuballa, P., Song, J.-H., Patel, K.K., Castoreno, A.B., Yilmaz, O.H., Jijon, H.B., Zhang, et al., 2013. Atg16l1 is required for autophagy in intestinal epithelial cells and protection of mice from *Salmonella* infection. *Gastroenterology* 145, 1347–1357. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.035>
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J.P., Campbell, B.J., Jewell, D., Simmons, A., 2010. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 16, 90–97. <https://doi.org/10.1038/nm.2069>
- Cooney, R., Jewell, D., 2009. The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Basel Switz.* 27, 428–442. <https://doi.org/10.1159/000234909>
- Cording, J., Berg, J., Käding, N., Bellmann, C., Tscheik, C., Westphal, J.K., Milatz, S., Günzel, D et al., 2013. In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J. Cell Sci.* 126, 554–564. <https://doi.org/10.1242/jcs.114306>
- Corfield, A.P., Myerscough, N., Bradfield, N., Corfield, C. do A., Gough, M., Clamp, J.R., Durdey, P., Warren, B.F., Bartolo, D.C., King, K.R., Williams, J.M., 1996. Colonic mucins in ulcerative colitis: evidence for loss of sulfation. *Glycoconj. J.* 13, 809–822.
- Corthésy, B., 2010. Role of secretory immunoglobulin A and secretory component in the protection of mucosal surfaces. *Future Microbiol.* 5, 817–829. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.39>

- Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., Gougis, S., Rizkalla, S., Batto, J.-M., Renault, P., ANR MicroObes consortium, Doré, J., Zucker, J.-D., Clément, K., Ehrlich, S.D., 2013. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500, 585–588. <https://doi.org/10.1038/nature12480>
- Cox, L.M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A.V., Leung, J.M., Cho, I., Kim, S.G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Zárata Rodriguez, J.G., Rogers, A.B., Robine, N., Loke, P., Blaser, M.J., 2014. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 158, 705–721. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052>
- Crişan, T.O., Plantinga, T.S., van de Veerdonk, F.L., Farcaş, M.F., Stoffels, M., Kullberg, B.-J., van der Meer, J.W.M., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., 2011. Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells. *PLoS One* 6, e18666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018666>
- Dai, C., Zhao, D.-H., Jiang, M., 2012. VSL#3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier *in vivo* and *in vitro* via the p38 and ERK signaling pathways. *Int. J. Mol. Med.* 29, 202–208. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.839>
- Darbaky, Y., Evrard, B., Patrier, S., Falenta, J., Garcin, S., Tridon, A., Dapoigny, M., Silberberg, C., Nivoliez, A., Diop, L., 2017. Oral probiotic treatment of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® prevents visceral hypersensitivity to a colonic inflammation and an acute psychological stress. *J. Appl. Microbiol.* 122, 188–200. <https://doi.org/10.1111/jam.13320>
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., Colombel, J.-F., 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421.
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J., 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- De Keersmaecker, S.C.J., Verhoeven, T.L.A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., Nagy, I., 2006. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 89–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x>
- Deretic, V., 2016. Autophagy in leukocytes and other cells: mechanisms, subsystem organization, selectivity, and links to innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 100, 969–978. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0216-079R>
- Deretic, V., Levine, B., 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 5, 527–549. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.016>
- Desai, H.G., Gupte, P.A., 2005. Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation? *Indian J. Gastroenterol. Off. J. Indian Soc. Gastroenterol.* 24, 23–24.

- Dethlefsen, L., Relman, D.A., 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>
- Deuring, J.J., Fuhler, G.M., Konstantinov, S.R., Peppelenbosch, M.P., Kuipers, E.J., de Haar, C., van der Woude, C.J., 2014. Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn's disease. *Gut* 63, 1081–1091. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303527>
- D'Haens, G., Hlavaty, T., 2004. Advances in medical therapy for Crohn's disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 6, 496–505.
- Di Giacinto, C., Marinaro, M., Sanchez, M., Strober, W., Boirivant, M., 2005. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 3237–3246.
- Dignass, A., Eliakim, R., Magro, F., Maaser, C., Chowers, Y., Geboes, K., Mantzaris, G., Reinisch, W., Colombel, J.-F., Vermeire, S., Travis, S., Lindsay, J.O., Van Assche, G., 2012. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J. Crohns Colitis* 6, 965–990. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.09.003>
- Dimidi, E., Christodoulides, S., Fragkos, K.C., Scott, S.M., Whelan, K., 2014. The effect of probiotics on functional constipation in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 100, 1075–1084. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.089151>
- Dinić, M., Lukić, J., Djokić, J., Milenković, M., Strahinić, I., Golić, N., Begović, J., 2017. *Lactobacillus fermentum* Postbiotic-induced Autophagy as Potential Approach for Treatment of Acetaminophen Hepatotoxicity. *Front. Microbiol.* 8, 594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00594>
- Dogi, C., García, G., De Moreno de LeBlanc, A., Greco, C., Cavaglieri, L., 2016. *Lactobacillus rhamnosus* RC007 intended for feed additive: immune-stimulatory properties and ameliorating effects on TNBS-induced colitis. *Benef. Microbes* 7, 539–547. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0147>
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Donkor, O.N., Ravikumar, M., Proudfoot, O., Day, S.L., Apostolopoulos, V., Paukovics, G., Vasiljevic, T., Nutt, S.L., Gill, H., 2012. Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 282–295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04496.x>
- Doré, J., Simrén, M., Buttle, L., Guarner, F., 2013. Hot topics in gut microbiota. *United Eur. Gastroenterol. J.* 1, 311–318. <https://doi.org/10.1177/2050640613502477>

- Drouault-Holowacz, S., Foligné, B., Dennin, V., Goudercourt, D., Terpend, K., Burckel, A., Pot, B., 2006. Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance: in vitro and in vivo considerations. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 25, 994–1003. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2006.03.006>
- Dubinsky, M.C., Johanson, J.F., Seidman, E.G., Ofman, J.J., 2002. Suspected inflammatory bowel disease—the clinical and economic impact of competing diagnostic strategies. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 2333–2342. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05988.x>
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C et al., 2006. A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science* 314, 1461–1463. <https://doi.org/10.1126/science.1135245>
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S et al., 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 386S-392S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.386s>
- Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., Deretic, V., 2011. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ . *EMBO J.* 30, 4701–4711. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.398>
- Earle, K.A., Billings, G., Sigal, M., Lichtman, J.S., Hansson, G.C., Elias, J.E., Amieva, M.R., Huang, K.C., Sonnenburg, J.L., 2015. Quantitative Imaging of Gut Microbiota Spatial Organization. *Cell Host Microbe* 18, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.09.002>
- Eaves-Pyles, T., Allen, C.A., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, C.B., Jezek, G.E., Islas-Islas, M., Torres, A.G., 2008. *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 298, 397–409. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.05.011>
- Eberl, G., 2005. Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? *Nat. Rev. Immunol.* 5, 413–420. <https://doi.org/10.1038/nri1600>
- Eeckhaut, V., Machiels, K., Perrier, C., Romero, C., Maes, S., Flahou, B., Steppe, M., Haesebrouck, F., Sas, B., Ducatelle, R., Vermeire, S., Van Immerseel, F., 2013. *Butyricoccus pullicaecorum* in inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 1745–1752. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303611>
- Ejtahed, H.S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., Mofid, V., 2012. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 28, 539–543. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.013>

- Ejtahed, H.S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., Mofid, V., Akbarian-Moghari, A., 2011. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J. Dairy Sci.* 94, 3288–3294. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4128>
- Elgazzar, A.H. (Ed.), 2015. *The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine*, 3rd ed. Springer International Publishing.
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., Flavell, R.A., 2011. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145, 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.022>
- Elliott, T.R., Hudspith, B.N., Rayment, N.B., Prescott, N.J., Petrovska, L., Hermon-Taylor, J., Brostoff, J., Boussioutas, A., Mathew, C.G., Sanderson, J.D., 2015. Defective macrophage handling of *Escherichia coli* in Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30, 1265–1274. <https://doi.org/10.1111/jgh.12955>
- Emge, J.R., Huynh, K., Miller, E.N., Kaur, M., Reardon, C., Barrett, K.E., Gareau, M.G., 2016. Modulation of the microbiota-gut-brain axis by probiotics in a murine model of inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310, G989-998. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00086.2016>
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A.L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H et al., 2015. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat. Neurosci.* 18, 965–977. <https://doi.org/10.1038/nn.4030>
- ESFA, 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* 8, 1763. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1763>
- Eun, S.-H., Lim, S.-M., Jang, S.-E., Han, M.J., Kim, D.-H., 2016. *Lactobacillus sakei* K17, an inducer of IL-10 expression in antigen-presenting cells, attenuates TNBS-induced colitis in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 38, 447–454. <https://doi.org/10.1080/08923973.2016.1233981>
- Evrard, B., Coudeyras, S., Dosgilbert, A., Charbonnel, N., Alamé, J., Tridon, A., Forestier, C., 2011. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS One* 6, e18735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018735>
- Ewe, K., Becker, K., Ueberschaer, B., 1996. Systemic uptake of 5-aminosalicylic acid from olsalazine and eudragit L coated mesalazine in patients with ulcerative colitis in remission. *Z. Gastroenterol.* 34, 225–229.
- Fanning, A.S., Anderson, J.M., 2009. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 113–120. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x>



- Fanning, A.S., Ma, T.Y., Anderson, J.M., 2002. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1835–1837. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0121fje>
- Farhadi, A., Banan, A., Fields, J., Keshavarzian, A., 2003. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 479–497.
- Faust, K., Lahti, L., Gonze, D., de Vos, W.M., Raes, J., 2015. Metagenomics meets time series analysis: unraveling microbial community dynamics. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.004>
- Favier, C., Neut, C., Mizon, C., Cortot, A., Colombel, J.F., Mizon, J., 1997. Fecal beta-D-galactosidase production and *Bifidobacteria* are decreased in Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 42, 817–822.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., Klionsky, D.J., 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24, 24–41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>
- Foligné, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., Pot, B., 2007a. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Gastroenterol.* 13, 236–243.
- Foligné, B., Zoumpopoulou, G., Dewulf, J., Ben Younes, A., Chareyre, F., Sirard, J.-C., Pot, B., Grangette, C., 2007b. A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality. *PLoS ONE* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000313>
- Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., Prifti, E., Vieira-Silva, S et al., 2015. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 528, 262–266. <https://doi.org/10.1038/nature15766>
- Forsythe, P., Sudo, N., Dinan, T., Taylor, V.H., Bienenstock, J., 2010. Mood and gut feelings. *Brain. Behav. Immun.* 24, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.05.058>
- Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., Núñez, G., 2012. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat. Immunol.* 13, 325–332. <https://doi.org/10.1038/ni.2231>
- Frank, D.N., Robertson, C.E., Hamm, C.M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., Zhu, W., Sartor, R.B., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R., Li, E., 2011. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 179–184. <https://doi.org/10.1002/ibd.21339>
- Fritz, T., Niederreiter, L., Adolph, T., Blumberg, R.S., Kaser, A., 2011. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* 60, 1580–1588. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.206466>
- Froicu, M., Zhu, Y., Cantorna, M.T., 2006. Vitamin D receptor is required to control gastrointestinal immunity in IL-10 knockout mice. *Immunology* 117, 310–318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02290.x>

- Fujita, N., Morita, E., Itoh, T., Tanaka, A., Nakaoka, M., Osada, Y., Umemoto, T., Saitoh, T., Nakatogawa, H et al., 2013. Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J. Cell Biol.* 203, 115–128. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304188>
- Fukata, M., Chen, A., Klepper, A., Krishnareddy, S., Vamadevan, A.S., Thomas, L.S., Xu, R., Inoue, H., Arditi, M., Dannenberg, A.J., Abreu, M.T., 2006. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 131, 862–877. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.06.017>
- Fukata, M., Hernandez, Y., Conduah, D., Cohen, J., Chen, A., Breglio, K., Goo, T., Hsu, D., Xu, R., Abreu, M.T., 2009. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 997–1006. <https://doi.org/10.1002/ibd.20880>
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
- Fuochi, V., Volti, G.L., Furneri, P.M., 2017. Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Human Oral Samples and Description of their Antibacterial Activity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 18, 138–149. <https://doi.org/10.2174/1389201017666161229153530>
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., Tsukita, S., 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141, 1539–1550.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S., 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.
- Galvez, J., Rodríguez-Cabezas, M.E., Zarzuelo, A., 2005. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 601–608. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500013>
- Garcia Vilela, E., De Lourdes De Abreu Ferrari, M., Oswaldo Da Gama Torres, H., Guerra Pinto, A., Carolina Carneiro Aguirre, A., Paiva Martins, F., Marcos Andrade Goulart, E., Sales Da Cunha, A., 2008. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scand. J. Gastroenterol.* 43, 842–848. <https://doi.org/10.1080/00365520801943354>
- Gardet, A., Xavier, R.J., 2012. Common alleles that influence autophagy and the risk for inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.08.001>
- Garg, M., Lubel, J.S., Sparrow, M.P., Holt, S.G., Gibson, P.R., 2012. Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease--established concepts and future directions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 36, 324–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05181.x>

- Geddes, K., Rubino, S.J., Magalhaes, J.G., Streutker, C., Le Bourhis, L., Cho, J.H., Robertson, S.J., Kim, C.J., Kaul, R., Philpott, D.J., Girardin, S.E., 2011. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. *Nat. Med.* 17, 837–844. <https://doi.org/10.1038/nm.2391>
- Geng, J., Klionsky, D.J., 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. *EMBO Rep.* 9, 859–864. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.163>
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V.S., Taylor, N., Maizels, R.M., Jay, P., 2016. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature16527>
- Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R., Di Sabatino, A., 2014. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* 13, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.004>
- Ghadimi, D., Fölster-Holst, R., de Vrese, M., Winkler, P., Heller, K.J., Schrezenmeir, J., 2008. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology* 213, 677–692. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.02.001>
- Ghislat, G., Lawrence, T., 2018. Autophagy in dendritic cells. *Cell. Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/cmi.2018.2>
- Ghouri, Y.A., Richards, D.M., Rahimi, E.F., Krill, J.T., Jelinek, K.A., DuPont, A.W., 2014. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 7, 473–487. <https://doi.org/10.2147/CEG.S27530>
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 278, 8869–8872. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
- Glocker, E.-O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E.M., Schäffer, A.A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J. et al., 2009. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N. Engl. J. Med.* 361, 2033–2045. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907206>
- Goldberg, R., Prescott, N., Lord, G.M., MacDonald, T.T., Powell, N., 2015. The unusual suspects—innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 271–283. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.52>
- Goldenberg, J., Lytvyn, L., Steurich, J., Parkin, P., Mahant, S., Johnston, B., 2015. Probiotics for the prevention antibiotic-associated diarrhea in children [WWW Document]. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004827.pub4>

- Goldenberg, J., Yap, C., Lytvyn, L., Lo, C., Beardsley, J., Mertz, D., Johnston, B., 2017. The use of probiotics to prevent *Clostridium difficile* diarrhea associated with antibiotic use [WWW Document]. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006095.pub4>
- Gong, Y., Lin, Y., Zhao, N., He, X., Lu, A., Wei, W., Jiang, M., 2016. The Th17/Treg Immune Imbalance in Ulcerative Colitis Disease in a Chinese Han Population. *Mediators Inflamm.* 2016, 7089137. <https://doi.org/10.1155/2016/7089137>
- Gou, S., Yang, Z., Liu, T., Wu, H., Wang, C., 2014. Use of probiotics in the treatment of severe acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit. Care* 18, R57. <https://doi.org/10.1186/cc13809>
- Grangette, C., Nutton, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., Pot, B., Hartung, T., Hols, P., Mercenier, A., 2005. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10321–10326. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504084102>
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2011. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front. Physiol.* 2, 94. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00094>
- Grohmann, U., Fallarino, F., Puccetti, P., 2003. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* 24, 242–248.
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P., 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 3–20; quiz 21–22. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Grundy, S.M., 2008. Promise of low-density lipoprotein-lowering therapy for primary and secondary prevention. *Circulation* 117, 569–573; discussion 573. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.720300>
- Guandalini, S., 2008. Probiotics for children with diarrhea: an update. *J. Clin. Gastroenterol.* 42 Suppl 2, S53-57. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181674087>
- Guigoz, Y., Doré, J., Schiffrin, E.J., 2008. The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 11, 13–20. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282f2bdf>
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., Testoni, P.A., 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 45, 1462–1464.
- Hahn, A., Thiessen, N., Pabst, R., Buettner, M., Bode, U., 2010. Mesenteric lymph nodes are not required for an intestinal immunoglobulin A response to oral cholera toxin. *Immunology* 129, 427–436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03197.x>
- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., Kontula, K., 2006. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 12, 3668–3672.

- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M et al., 2007. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* 39, 207–211. <https://doi.org/10.1038/ng1954>
- Han, C., Ding, Z., Shi, H., Qian, W., Hou, X., Lin, R., 2016. The Role of Probiotics in Lipopolysaccharide-Induced Autophagy in Intestinal Epithelial Cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 38, 2464–2478. <https://doi.org/10.1159/000445597>
- Han, J.-L., Lin, H.-L., 2014. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: from mechanism insights to therapeutic perspective. *World J. Gastroenterol.* 20, 17737–17745. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17737>
- Hansen, J., Gulati, A., Sartor, R.B., 2010. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 564–571. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32833f1195>
- Hara, T., Mizushima, N., 2009. Role of ULK-FIP200 complex in mammalian autophagy: FIP200, a counterpart of yeast Atg17? *Autophagy* 5, 85–87.
- Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S.G., O'Shea, A., Sharp, F.A., Lambe, E.M., Creagh, E.M., Golenbock, D.T., Tschopp, J., Kornfeld, H., Fitzgerald, K.A., Lavelle, E.C., 2011. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J. Biol. Chem.* 286, 9587–9597. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.202911>
- Hashash, J.G., Chintamaneni, P., Ramos Rivers, C.M., Koutroubakis, I.E., Regueiro, M.D., Baidoo, L., Swoger, J.M., Barrie, A., Schwartz, M., Dunn, M.A., Binion, D.G., 2015. Patterns of Antibiotic Exposure and Clinical Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease: A 4-year Prospective Study. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 2576–2582. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000534>
- He, C., Klionsky, D.J., 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornall, R.J., Adams, R., Kato, M., Nelms, K.A., Hong, N.A., Florin, T.H.J., Goodnow, C.C., McGuckin, M.A., 2008. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 5, e54. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050054>
- Hegazy, S.K., El-Bedewy, M.M., 2010. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* 16, 4145–4151.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., Schulzke, J.D., 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129, 550–564. <https://doi.org/10.1016/j.gastro.2005.05.002>

- Henderson, P., van Limbergen, J.E., Wilson, D.C., Satsangi, J., Russell, R.K., 2011. Genetics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 346–361. <https://doi.org/10.1002/ibd.21283>
- Heresbach, D., Gulwani-Akolkar, B., Lesser, M., Akolkar, P.N., Lin, X.Y., Heresbach-Le Berre, N., Bretagne, J.F., Katz, S., Silver, J., 1998. Anticipation in Crohn's disease may be influenced by gender and ethnicity of the transmitting parent. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 2368–2372. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1998.00689.x>
- Hidalgo-Cantabrana, C., Algeri, F., Rodriguez-Nogales, A., Vezza, T., Martínez-Cambor, P., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P., Gálvez, J., 2016. Effect of a Ropy Exopolysaccharide-Producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Strain Orally Administered on DSS-Induced Colitis Mice Model. *Front. Microbiol.* 7, 868. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00868>
- Hijová, E., Šoltésová, A., Salaj, R., Kuzma, J., Strojny, L., Bomba, A., Gregová, K., 2015. Preventive use of *Lactobacillus plantarum* LS/07 and inulin to relieve symptoms of acute colitis. *Acta Biochim. Pol.* 62, 553–557. [https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1008](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1008)
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hlivak, P., Odraska, J., Ferencik, M., Ebringer, L., Jahnova, E., Mikes, Z., 2005. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratisl. Lek. Listy* 106, 67–72.
- Höcker, M., Wiedenmann, B., 1998. Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 859, 160–174.
- Hoentjen, F., Harmsen, H.J.M., Braat, H., Torrice, C.D., Mann, B.A., Sartor, R.B., Dieleman, L.A., 2003. Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut* 52, 1721–1727.
- Höie, O., Wolters, F., Riis, L., Aamodt, G., Solberg, C., Bernklev, T., Odes, S., Mouzas, I.A., Beltrami, M., Langholz, E., Stockbrügger, R., Vatn, M., Moum, B., European Collaborative Study Group of Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD), 2007. Ulcerative colitis: patient characteristics may predict 10-yr disease recurrence in a European-wide population-based cohort. *Am. J. Gastroenterol.* 102, 1692–1701. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01265.x>
- Hold, G.L., Smith, M., Grange, C., Watt, E.R., El-Omar, E.M., Mukhopadhyaya, I., 2014. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J. Gastroenterol.* 20, 1192–1210. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1192>

- Hollander, D., Vadheim, C.M., Brettholz, E., Petersen, G.M., Delahunty, T., Rotter, J.I., 1986. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann. Intern. Med.* 105, 883–885.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 365S–373S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>
- Hong, Y.-S., Ahn, Y.-T., Park, J.-C., Lee, J.-H., Lee, H., Huh, C.-S., Kim, D.-H., Ryu, D.H., Hwang, G.-S., 2010. <sup>1</sup>H NMR-based metabonomic assessment of probiotic effects in a colitis mouse model. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1091–1101. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0716-1>
- Hooper, L.V., Macpherson, A.J., 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 159–169. <https://doi.org/10.1038/nri2710>
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.-L., Oshiro, N., Mizushima, N., 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-12-1248>
- Hou, J.K., Abraham, B., El-Serag, H., 2011. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 563–573. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.44>
- Hou, Q., Ye, L., Liu, H., Huang, L., Yang, Q., Turner, J.R., Yu, Q., 2018. *Lactobacillus* accelerates ISCs regeneration to protect the integrity of intestinal mucosa through activation of STAT3 signaling pathway induced by LPLs secretion of IL-22. *Cell Death Differ.* 25, 1657–1670. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0070-2>
- Hoyler, T., Klose, C.S.N., Souabni, A., Turqueti-Neves, A., Pfeifer, D., Rawlins, E.L., Voehringer, D., Busslinger, M., Diefenbach, A., 2012. The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 37, 634–648. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.020>
- Hoyos, A.B., 1999. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 3, 197–202.
- Hsieh, C.-Y., Osaka, T., Moriyama, E., Date, Y., Kikuchi, J., Tsuneda, S., 2015. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol. Rep.* 3. <https://doi.org/10.14814/phy2.12327>
- Hu, C.-A.A., Hou, Y., Yi, D., Qiu, Y., Wu, G., Kong, X., Yin, Y., 2015. Autophagy and tight junction proteins in the intestine and intestinal diseases. *Anim. Nutr. Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui* 1, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.014>
- Huber, L.A., Teis, D., 2016. Lysosomal signaling in control of degradation pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 39, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.006>

- Huda-Faujan, N., Abdulmir, A.S., Fatimah, A.B., Anas, O.M., Shuhaimi, M., Yazid, A.M., Loong, Y.Y., 2010. The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *Open Biochem. J.* 4, 53–58. <https://doi.org/10.2174/1874091X01004010053>
- Hudcovic, T., Stěpánková, R., Cebra, J., Tlaskalová-Hogenová, H., 2001. The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiol. (Praha)* 46, 565–572.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603. <https://doi.org/10.1038/35079107>
- Hulston, C.J., Churnside, A.A., Venables, M.C., 2015. Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects. *Br. J. Nutr.* 113, 596–602. <https://doi.org/10.1017/S0007114514004097>
- Human Microbiome Project Consortium, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Hummel, S., Veltman, K., Cichon, C., Sonnenborn, U., Schmidt, M.A., 2012. Differential targeting of the E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin complex by gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1140–1147. <https://doi.org/10.1128/AEM.06983-11>
- Hurley, J.H., Schulman, B.A., 2014. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion. *Cell* 157, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.070>
- Hutchins, A.P., Diez, D., Miranda-Saavedra, D., 2013. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief. Funct. Genomics* 12, 489–498. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt028>
- Huurre, A., Laitinen, K., Rautava, S., Korkeamäki, M., Isolauri, E., 2008. Impact of maternal atopy and probiotic supplementation during pregnancy on infant sensitization: a double-blind placebo-controlled study. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 38, 1342–1348. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03008.x>
- Ibarra, A., Acha, R., Calleja, M.-T., Chiralt-Boix, A., Wittig, E., 2012. Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *J. Dairy Sci.* 95, 3536–3548. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5050>
- Iida, T., Onodera, K., Nakase, H., 2017. Role of autophagy in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 23, 1944–1953. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i11.1944>
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, Sachiko, Tsukita, Shoichiro, 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 171, 939–945. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510043>



- Imielinski, M., Baldassano, R.N., Griffiths, A., Russell, R.K., Annese, V., Dubinsky, M., Kugathasan, S et al., 2009. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 41, 1335–1340. <https://doi.org/10.1038/ng.489>
- Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E., Salminen, S., 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 30, 1604–1610.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Mizushima, N., 2012. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151, 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>
- Izumi, H., Minegishi, M., Sato, Y., Shimizu, T., Sekine, K., Takase, M., 2015. *Bifidobacterium breve* alters immune function and ameliorates DSS-induced inflammation in weanling rats. *Pediatr. Res.* 78, 407–416. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.115>
- Jäger, A., Kuchroo, V.K., 2010. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand. J. Immunol.* 72, 173–184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x>
- Jahnsen, J., Røseth, A.G., Aadland, E., 2009. [Measurement of calprotectin in faeces]. *Tidsskr. Den Nor. Laegeforening Tidsskr. Prakt. Med. Ny Raekke* 129, 743–745. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.08.0010>
- Jantchou, P., Morois, S., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., Carbonnel, F., 2010. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2195–2201. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.192>
- Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., Mizushima, N., 2014. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* 25, 1327–1337. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-08-0447>
- Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjövall, H., Hansson, G.C., 2014. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 281–291. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303207>
- Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., 2014. Is the intestinal goblet cell a major immune cell? *Cell Host Microbe* 15, 251–252. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.014>
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C., 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- John, B.M., Devgan, A., Mitra, B., 2014. Prevalence of rotavirus infection in children below two years presenting with diarrhea. *Med. J. Armed Forces India* 70, 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.02.008>

- John, L.J., Fromm, M., Schulzke, J.-D., 2011. Epithelial Barriers in Intestinal Inflammation. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1255–1270. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3892>
- Johnson-Henry, K.C., Nadjafi, M., Avitzur, Y., Mitchell, D.J., Ngan, B.-Y., Galindo-Mata, E., Jones, N.L., Sherman, P.M., 2005. Amelioration of the effects of *Citrobacter rodentium* infection in mice by pretreatment with probiotics. *J. Infect. Dis.* 191, 2106–2117. <https://doi.org/10.1086/430318>
- Jones, M.L., Martoni, C.J., Parent, M., Prakash, S., 2012. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *Br. J. Nutr.* 107, 1505–1513. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004703>
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P et al., 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119–124. <https://doi.org/10.1038/nature11582>
- Jounai, N., Kobiyama, K., Shiina, M., Ogata, K., Ishii, K.J., Takeshita, F., 2011. NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with beclin1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 1646–1655. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001654>
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., Kim, D.-H., 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-12-1249>
- Kabat, A.M., Harrison, O.J., Riffelmacher, T., Moghaddam, A.E., Pearson, C.F., Laing, A., Abeler-Dörner, L., Forman, S.P., Grecis, R.K., Sattentau, Q., Simon, A.K., Pott, J., Maloy, K.J., 2016. The autophagy gene Atg16l1 differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation. *eLife* 5, e12444. <https://doi.org/10.7554/eLife.12444>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* 117, 2805–2812. <https://doi.org/10.1242/jcs.01131>
- Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., Okano, M., Kagoshima, M., Tsuchida, T., 2010. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64, 636–643. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.19>
- Kadooka, Y., Sato, M., Ogawa, A., Miyoshi, M., Uenishi, H., Ogawa, H., Ikuyama, K., Kagoshima, M., Tsuchida, T., 2013. Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 110, 1696–1703. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001037>

- Kaetzel, C.S., 2005. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol. Rev.* 206, 83–99. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00278.x>
- Kakuta, Y., Kinouchi, Y., Negoro, K., Takahashi, S., Shimosegawa, T., 2006. Association study of TNFSF15 polymorphisms in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 55, 1527–1528. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.100297>
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Isolauri, E., 2007. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1019–1021. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.608>
- Kamiya, T., Wang, L., Forsythe, P., Goettsche, G., Mao, Y., Wang, Y., Tougas, G., Bienenstock, J., 2006. Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut* 55, 191–196. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.070987>
- Kapsenberg, M.L., 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 984–993. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
- Karakan, T., Ergun, M., Dogan, I., Cindoruk, M., Unal, S., 2007. Comparison of early enteral nutrition in severe acute pancreatitis with prebiotic fiber supplementation versus standard enteral solution: A prospective randomized double-blind study. *World J. Gastroenterol. WJG* 13, 2733–2737. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i19.2733>
- Karczewski, J., Troost, F.J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R.-J.M., Wells, J.M., 2010. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G851-859. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00327.2009>
- Karska-Wysocki, B., Bazo, M., Smoragiewicz, W., 2010. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol. Res.* 165, 674–686. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.008>
- Kaser, A., Blumberg, R.S., 2011. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140, 1738–1747. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.048>
- Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R.S., 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 573–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>
- Kassaa, I.A., 2017. *New Insights on Antiviral Probiotics: From Research to Applications.* Springer International Publishing.
- Kassaa, I.A., Hober, D., Hamze, M., Caloone, D., Dewilde, A., Chihib, N., Drider, D., 2015. Vaginal *Lactobacillus gasseri* CMUL57 can inhibit herpes simplex type 2 but not Coxsackievirus B4E2. *Arch. Microbiol.* 197, 657–664. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1101-8>

- Ke, P., Shao, B.-Z., Xu, Z.-Q., Wei, W., Han, B.-Z., Chen, X.-W., Su, D.-F., Liu, C., 2016. Activation of Cannabinoid Receptor 2 Ameliorates DSS-Induced Colitis through Inhibiting NLRP3 Inflammasome in Macrophages. *PLOS ONE* 11, e0155076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155076>
- Kechaou, N., Chain, F., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bertho, N., Chevalier, C., Le Goffic, R., Courau, S., Molimard, P., Chatel, J.M., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., 2013. Identification of one novel candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strain active against influenza virus infection in mice by a large-scale screening. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1491–1499. <https://doi.org/10.1128/AEM.03075-12>
- Kelsall, B.L., 2008. Innate and adaptive mechanisms to control [corrected] pathological intestinal inflammation. *J. Pathol.* 214, 242–259. <https://doi.org/10.1002/path.2286>
- Khan, K.J., Ullman, T.A., Ford, A.C., Abreu, M.T., Abadir, Amir, Abadir, A., Marshall, J.K., Talley, N.J., Moayyedi, P., 2011. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 661–673. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.72>
- Khor, B., Gardet, A., Xavier, R.J., 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317. <https://doi.org/10.1038/nature10209>
- Kim, Y., Koh, J.H., Ahn, Y.J., Oh, S., Kim, S.H., 2015. The Synergic Anti-inflammatory Impact of *Gleditsia sinensis* Lam. and *Lactobacillus brevis* KY21 on Intestinal Epithelial Cells in a DSS-induced Colitis Model. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 35, 604–610. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.5.604>
- Klag, T., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2013. Defective antibacterial barrier in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Basel Switz.* 31, 310–316. <https://doi.org/10.1159/000354858>
- Kleerebezem, M., Vaughan, E.E., 2009. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 269–290. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073341>
- Klement, E., Cohen, R.V., Boxman, J., Joseph, A., Reif, S., 2004. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1342–1352. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1342>
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A. et al., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
- Klotz, U., Schwab, M., 2005. Topical delivery of therapeutic agents in the treatment of inflammatory bowel disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.08.007>
- Kmieć, Z., Cyman, M., Ślebioda, T.J., 2017. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv. Med. Sci.* 62, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2016.09.001>

- Knights, D., Silverberg, M.S., Weersma, R.K., Gevers, D., Dijkstra, G., Huang, Hailiang, Tyler, A.D., van Sommeren, S., Imhann, F., Stempak, J.M., Huang, Hu, Vangay, P., Al-Ghalith, G.A., Russell, C., Sauk, J., Knight, J., Daly, M.J., Huttenhower, C., Xavier, R.J., 2014. Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med.* 6, 107. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0107-1>
- Ko, J.-S., Yang, H.-R., Chang, J.-Y., Seo, J.-K., 2007. *Lactobacillus plantarum* inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor-alpha. *World J. Gastroenterol.* 13, 1962–1965.
- Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., Ley, R.E., 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4578–4585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>
- Kohn, A., Prantera, C., Pera, A., Cosentino, R., Sostegni, R., Daperno, M., 2004. Infliximab in the treatment of severe ulcerative colitis: a follow-up study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 8, 235–237.
- Kotlarz, D., Beier, R., Murugan, D., Diestelhorst, J., Jensen, O., Boztug, K., Pfeifer, D., Kreipe, H et al., 2012. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 143, 347–355. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.045>
- Kruis, W., Fris, P., Pokrotnieks, J., Lukás, M., Fixa, B., Kascák, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., Schulze, J., 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617–1623. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.037747>
- Kugathasan, S., Baldassano, R.N., Bradfield, J.P., Sleiman, P.M.A., Imielinski, M., Guthery, S.L. et al., 2008. Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 40, 1211–1215. <https://doi.org/10.1038/ng.203>
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Müller, W., 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263–274.
- Kumar, M., Kisson-Singh, V., Coria, A.L., Moreau, F., Chadee, K., 2017. Probiotic mixture VSL#3 reduces colonic inflammation and improves intestinal barrier function in Muc2 mucin-deficient mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 312, G34–G45. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00298.2016>
- Kurata, J.H., Kantor-Fish, S., Frankl, H., Godby, P., Vadheim, C.M., 1992. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 102, 1940–1948.
- Kurtovic, J., Segal, I., 2004. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. *Trop. Gastroenterol. Off. J. Dig. Dis. Found.* 25, 9–14.
- Kwon, D.H., Song, H.K., 2018. A Structural View of Xenophagy, a Battle between Host and Microbes. *Mol. Cells* 41, 27–34. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2274>

- Kwon, H.-K., Lee, C.-G., So, J.-S., Chae, C.-S., Hwang, J.-S., Sahoo, A., Nam, J.H., Rhee, J.H., Hwang, K.-C., Im, S.-H., 2010. Generation of regulatory dendritic cells and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2159–2164. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904055107>
- Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nuñez, G., Keshav, S., 2003. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125, 47–57.
- Lal-Nag, M., Morin, P.J., 2009. The claudins. *Genome Biol.* 10, 235. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-8-235>
- Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R.J., Darfeuille-Michaud, A., 2010. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* 12, 99–113. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01381.x>
- Lapaquette, P., Thi Thu Nguyen, H., Faure, M., 2017. L'autophagie garante de l'immunité et de l'inflammation: « Tout est bien, tout va bien, tout va pour le mieux qu'il soit possible\* ». *médecine/sciences* 33, 305–311. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173303018>
- Larsen, N., Vogensen, F.K., van den Berg, F.W.J., Nielsen, D.S., Andreasen, A.S., Pedersen, B.K., Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J., Hansen, L.H., Jakobsen, M., 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS One* 5, e9085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>
- Lassen, K.G., Kuballa, P., Conway, K.L., Patel, K.K., Becker, C.E., Peloquin, J.M., Villablanca, E.J. et al., 2014. Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 7741–7746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407001111>
- Laulund, S., Wind, A., Derkx, P.M.F., Zuliani, V., 2017. Regulatory and Safety Requirements for Food Cultures. *Microorganisms* 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020028>
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M et al., 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>
- LeBlanc, J.G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L.G., Courau, S., Langella, P., 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb. Cell Factories* 16. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0691-z>
- Lee, B., Lee, J.-H., Lee, H.-S., Bae, E.-A., Huh, C.-S., Ahn, Y.-T., Kim, D.-H., 2009. Glycosaminoglycan degradation-inhibitory lactic acid bacteria ameliorate 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 616–621.

- Lee, H.K., Mattei, L.M., Steinberg, B.E., Alberts, P., Lee, Y.H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., Iwasaki, A., 2010. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* 32, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.12.006>
- Lee, J., Kim, H.R., Quinley, C., Kim, J., Gonzalez-Navajas, J., Xavier, R., Raz, E., 2012. Autophagy suppresses interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways. *J. Biol. Chem.* 287, 4033–4040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280065>
- Lee, J.H., Noh, J., Noh, G., Choi, W.S., Cho, S., Lee, S.S., 2011. Allergen-Specific Transforming Growth Factor- $\beta$ -Producing CD19(+)CD5(+) Regulatory B-Cell (Br3) Responses in Human Late Eczematous Allergic Reactions to Cow's Milk. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 441–449. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0020>
- Lee, S.H., 2015. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest. Res.* 13, 11–18. <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.11>
- Lennard-Jones, J.E., 1989. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 170, 2–6; discussion 16-19.
- Lenoir-Wijnkoop, I., Nuijten, M.J.C., Craig, J., Butler, C.C., 2014. Nutrition economic evaluation of a probiotic in the prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Front. Pharmacol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00013>
- Leone, V.A., Cham, C.M., Chang, E.B., 2014. Diet, gut microbes, and genetics in immune function: can we leverage our current knowledge to achieve better outcomes in inflammatory bowel diseases? *Curr. Opin. Immunol.* 31, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.08.004>
- Lepage, P., Häslér, R., Spehlmann, M.E., Rehman, A., Zvirbliene, A., Begun, A., Ott, S., Kupcinskis, L., Doré, J., Raedler, A., Schreiber, S., 2011. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 141, 227–236. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.011>
- Leslie, W.D., Miller, N., Rogala, L., Bernstein, C.N., 2008. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1451–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01753.x>
- Levine, B., Mizushima, N., Virgin, H.W., 2011. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469, 323–335. <https://doi.org/10.1038/nature09782>
- Levy, M., Thaiss, C.A., Katz, M.N., Suez, J., Elinav, E., 2015. Inflammasomes and the microbiota—partners in the preservation of mucosal homeostasis. *Semin. Immunopathol.* 37, 39–46. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0451-7>
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>

- Li, H., Cao, Y., 2010. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids* 39, 1107–1116. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0582-7>
- Li, W., Yang, Q., Mao, Z., 2011. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 749–763. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0565-6>
- Lichtenstein, L., Avni-Biron, I., Ben-Bassat, O., 2016. Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 30, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.002>
- Liévin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L., 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47, 646–652.
- Liévin-Le Moal, V., Amsellem, R., Servin, A.L., Coconnier, M.-H., 2002. *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic *Escherichia coli* in human enterocyte-like cells. *Gut* 50, 803–811.
- Liévin-Le Moal, V., Servin, A.L., 2013. Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 77, 380–439. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00064-12>
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H., 1965. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. *Science* 147, 747–748.
- Lin, P.-P., Hsieh, Y.-M., Tsai, C.-C., 2009. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* RY2 isolated from healthy infancy feces on the growth and adhesion characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Anaerobe* 15, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.01.009>
- Lin, R., Jiang, Y., Zhao, X.Y., Guan, Y., Qian, W., Fu, X.C., Ren, H.Y., Hou, X.H., 2014. Four types of Bifidobacteria trigger autophagy response in intestinal epithelial cells. *J. Dig. Dis.* 15, 597–605. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12179>
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 7, 149–163.
- Liu, E., Van Grol, J., Subauste, C.S., 2015. Atg5 but not Atg7 in dendritic cells enhances IL-2 and IFN- $\gamma$  production by Toxoplasma gondii-reactive CD4<sup>+</sup> T cells. *Microbes Infect.* 17, 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.008>
- Liu, J.Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S.C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J.C. et al., 2015. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.* 47, 979–986. <https://doi.org/10.1038/ng.3359>
- Liu, P.T., Krutzik, S.R., Modlin, R.L., 2007. Therapeutic implications of the TLR and VDR partnership. *Trends Mol. Med.* 13, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.01.006>



- Liu, Z.Q., Wu, Y., Song, J.P., Liu, X., Liu, Z., Zheng, P.Y., Yang, P.C., 2013. Tolerogenic CX3CR1+ B cells suppress food allergy-induced intestinal inflammation in mice. *Allergy* 68, 1241–1248. <https://doi.org/10.1111/all.12218>
- Loftus, E.V., 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504–1517.
- Lomasney, K.W., Houston, A., Shanahan, F., Dinan, T.G., Cryan, J.F., Hyland, N.P., 2014. Selective influence of host microbiota on cAMP-mediated ion transport in mouse colon. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 26, 887–890. <https://doi.org/10.1111/nmo.12328>
- López Ramos, D., Gabriel, R., Cantero Perona, J., Moreno Otero, R., Fernández Bermejo, M., Maté Jiménez, J., 2001. Association of MALTectomy (appendectomy and tonsillectomy) and inflammatory bowel disease: a familial case-control study. *Rev. Espanola Enfermedades Dig. Organó Of. Soc. Espanola Patol. Dig.* 93, 303–314.
- Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Abellà, C., Busquets, D., Sabat-Mir, M., Duncan, S.H., Aldeguer, X., Flint, H.J., Garcia-Gil, L.J., 2015. Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* phylotype richness is reduced in patients with inflammatory bowel disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7582–7592. <https://doi.org/10.1128/AEM.02006-15>
- Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Surís-Valls, R., Aldeguer, X., Sabat-Mir, M., Duncan, S.H., Flint, H.J., Garcia-Gil, L.J., 2016. Changes in the Abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* Phylogroups I and II in the Intestinal Mucosa of Inflammatory Bowel Disease and Patients with Colorectal Cancer. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 28–41. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000590>
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J., Gonzalez, A., Ackermann, G., Wendel, D., Vázquez-Baeza, Y., Jansson, J.K., Gordon, J.I., Knight, R., 2013. Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome Res.* 23, 1704–1714. <https://doi.org/10.1101/gr.151803.112>
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lu, L., Barbi, J., Pan, F., 2017. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 703–717. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.75>
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rössner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G., 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77–92.
- Ma, D., Forsythe, P., Bienenstock, J., 2004. Live *Lactobacillus rhamnosus* [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect. Immun.* 72, 5308–5314. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5308-5314.2004>

- Ma, E.L., Choi, Y.J., Choi, J., Pothoulakis, C., Rhee, S.H., Im, E., 2010. The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. *Int. J. Cancer* 127, 780–790. <https://doi.org/10.1002/ijc.25011>
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 67–72. <https://doi.org/10.1079/PNS2002207>
- Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijs, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Van Immerseel, F., Verbeke, K., Ferrante, M., Verhaegen, J., Rutgeerts, P., Vermeire, S., 2014. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 1275–1283. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304833>
- Macho Fernandez, E., Fernandez, E.M., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I.G., Grangette, C., 2011. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 60, 1050–1059. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.232918>
- Macias-Ceja, D.C., Cosín-Roger, J., Ortiz-Masiá, D., Salvador, P., Hernández, C., Esplugues, J.V., Calatayud, S., Barrachina, M.D., 2017. Stimulation of autophagy prevents intestinal mucosal inflammation and ameliorates murine colitis. *Br. J. Pharmacol.* 174, 2501–2511. <https://doi.org/10.1111/bph.13860>
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., Hollingsworth, M.A., 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827–833.
- Mackos, A.R., Galley, J.D., Eubank, T.D., Easterling, R.S., Parry, N.M., Fox, J.G., Lyte, M., Bailey, M.T., 2016. Social stress-enhanced severity of *Citrobacter rodentium*-induced colitis is CCL2-dependent and attenuated by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Mucosal Immunol.* 9, 515–526. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.81>
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., De Simone, C., 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121, 580–591.
- Malchow, H.A., 1997. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J. Clin. Gastroenterol.* 25, 653–658.
- Maloy, K.J., Powrie, F., 2011. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature10208>
- Mañé, J., Lorén, V., Pedrosa, E., Ojanguren, I., Xaus, J., Cabré, E., Domènech, E., Gassull, M.A., 2009. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 prevents and reverts intestinal damage on TNBS-induced colitis in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 1155–1163. <https://doi.org/10.1002/ibd.20908>

- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., Dore, J., 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205–211. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>
- Mankertz, J., Amasheh, M., Krug, S.M., Fromm, A., Amasheh, S., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Fromm, M., Schulzke, J.D., 2009. TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.* 336, 67–77. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0751-8>
- Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, E.O., Fromm, M., Schulzke, J.D., 2000. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 11), 2085–2090.
- Manzhali, E., Virchenko, O., Falalyeyeva, T., Beregova, T., Stremmel, W., 2017. Treatment efficacy of a probiotic preparation for non-alcoholic steatohepatitis: A pilot trial. *J. Dig. Dis.* 18, 698–703. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12561>
- Marieb, E.N. (1936-), Lachaine, R., Lachaine, R., 1999. *Anatomie et physiologie humaines / Elaine N. Marieb,...* Éd. du Renouveau pédagogique. [Saint-Laurent (Québec)].
- Marteau, P., Lémann, M., Seksik, P., Laharie, D., Colombel, J.F., Bouhnik, Y., Cadot, G., Soulé, J.C et al., 2006. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut* 55, 842–847. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.076604>
- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Motta, J.-P., Vergnolle, N., Sokol, H., Langella, P., 2017. Using murine colitis models to analyze probiotics–host interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S49–S70. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux035>
- Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M.L., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J.M., 2009. Isolation of *bifidobacteria* from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 965–969. <https://doi.org/10.1128/AEM.02063-08>
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M., 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143, 754–758. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.09.028>
- Martín, R., Laval, L., Chain, F., Miquel, S., Natividad, J., Cherbuy, C., Sokol, H., Verdu, E.F., van Hylckama Vlieg, J., Bermudez-Humaran, L.G., Smokvina, T., Langella, P., 2016. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM-I2494 Restores Gut Barrier Permeability in Chronically Low-Grade Inflamed Mice. *Front. Microbiol.* 7, 608. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00608>
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., Dejana, E., 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142, 117–127.

- Massey, D.C.O., Bredin, F., Parkes, M., 2008. Use of sirolimus (rapamycin) to treat refractory Crohn's disease. *Gut* 57, 1294–1296. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.157297>
- Mastromarino, P., Vitali, B., Mosca, L., 2013. Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. *New Microbiol.* 36, 229–238.
- Mattar, A.F., Teitelbaum, D.H., Drongowski, R.A., Yongyi, F., Harmon, C.M., Coran, A.G., 2002. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr. Surg. Int.* 18, 586–590. <https://doi.org/10.1007/s00383-002-0855-7>
- Maunder, R.G., 2005. Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: evaluation, synthesis, and future directions. *Inflamm. Bowel Dis.* 11, 600–608.
- Mawdsley, J.E., Rampton, D.S., 2006. The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. *Neuroimmunomodulation* 13, 327–336. <https://doi.org/10.1159/000104861>
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., Rescigno, M., 2014. Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1<sup>+</sup> macrophages to CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Immunity* 40, 248–261. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.012>
- McCarthy, J., O'Mahony, L., O'Callaghan, L., Sheil, B., Vaughan, E.E., Fitzsimons, N., Fitzgibbon, J., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F., 2003. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 52, 975–980.
- McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., Florin, T.H., 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 265–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Meimandipour, A., Hair-Bejo, M., Shuhaimi, M., Azhar, K., Soleimani, A.F., Rasti, B., Yazid, A.M., 2010. Gastrointestinal tract morphological alteration by unpleasant physical treatment and modulating role of *Lactobacillus* in broilers. *Br. Poult. Sci.* 51, 52–59. <https://doi.org/10.1080/00071660903394455>
- Mencarelli, A., Cipriani, S., Renga, B., Bruno, A., D'Amore, C., Distrutti, E., Fiorucci, S., 2012. VSL#3 Resets Insulin Signaling and Protects against NASH and Atherosclerosis in a Model of Genetic Dyslipidemia and Intestinal Inflammation. *PLOS ONE* 7, e45425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045425>
- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., Bruewer, M., 2009. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G1140–1149. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90534.2008>

- Merad, M., Sathe, P., Helfft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- Mercer, C.A., Kaliappan, A., Dennis, P.B., 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 5, 649–662.
- Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., Bisson, J.-F., Rougeot, C., Pichelin, M., Cazaubiel, M., Cazaubiel, J.-M., 2011a. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br. J. Nutr.* 105, 755–764. <https://doi.org/10.1017/S0007114510004319>
- Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J.-F., Desor, D., Javelot, H., Rougeot, C., 2011b. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes* 2, 256–261. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.16108>
- Mezzasalma, V., Manfrini, E., Ferri, E., Boccarusso, M., Di Gennaro, P., Schiano, I., Michelotti, A., Labra, M., 2017. Orally administered multispecies probiotic formulations to prevent uro-genital infections: a randomized placebo-controlled pilot study. *Arch. Gynecol. Obstet.* 295, 163–172. <https://doi.org/10.1007/s00404-016-4235-2>
- Miele, E., Pascarella, F., Giannetti, E., Quaglietta, L., Baldassano, R.N., Staiano, A., 2009. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 437–443. <https://doi.org/10.1038/ajg.2008.118>
- Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I.D., Rescigno, M., 2009. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PloS One* 4, e7056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007056>
- Miller, H., Zhang, J., KuoLee, R., Patel, G.B., Chen, W., 2007. Intestinal M cells: The fallible sentinels? *World J. Gastroenterol. WJG* 13, 1477–1486. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i10.1477>
- Miura, K., Ohnishi, H., 2014. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 7381–7391. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7381>
- Mizushima, N., 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2003. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 116, 1679–1688.

- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 1998. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 273, 33889–33892.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Mohamadshahi, M., Veissi, M., Haidari, F., Javid, A.Z., Mohammadi, F., Shirbeigi, E., 2014. Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* 19, 531–536.
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W.V., Ruthel, G., Demmin, G.L., Warfield, K.L., Bavari, S., Klaenhammer, T.R., 2005. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2880–2885. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500098102>
- Möndel, M., Schroeder, B.O., Zimmermann, K., Huber, H., Nuding, S., Beisner, J., Fellermann, K., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2009. Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunol.* 2, 166–172. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.77>
- Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V., Reyes, J.A., Shah, S.A., LeLeiko, N., Snapper, S.B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B.E., Xavier, R.J., Huttenhower, C., 2012. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 13, R79. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H., Koyasu, S., 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463, 540–544. <https://doi.org/10.1038/nature08636>
- Motta, J.-P., Bermúdez-Humarán, L.G., Deraison, C., Martin, L., Rolland, C., Rousset, P., Boue, J., Dietrich, G., Chapman, K., Kharrat, P., Vinel, J.-P., Alric, L., Mas, E., Sallenave, J.-M., Langella, P., Vergnolle, N., 2012. Food-Grade Bacteria Expressing Elafin Protect Against Inflammation and Restore Colon Homeostasis. *Sci. Transl. Med.* 4, 158ra144-158ra144. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004212>
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M.C., Clavel, T., Koebnick, C., Zunft, H.-J.F., Doré, J., Blaut, M., 2006. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1027–1033. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006>
- Muftuoglu, M. a. T., Isikgor, S., Tosun, S., Saglam, A., 2006. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60, 464–468. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602338>

- Müller, A.J., Kaiser, P., Dittmar, K.E.J., Weber, T.C., Haueter, S., Endt, K., Songhet, P., Zellweger, C., Kremer, M., Fehling, H.-J., Hardt, W.-D., 2012. Salmonella gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. *Cell Host Microbe* 11, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.11.013>
- Munkholm, P., Langholz, E., Nielsen, O.H., Kreiner, S., Binder, V., 1992. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand. J. Gastroenterol.* 27, 609–614.
- Muñoz, J.A.M., Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Ramón, D., Genovés, S., Montava, R., Ribes, J.M., Buesa, J., Fàbrega, J., Rivero, M., 2011. Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8775–8783. <https://doi.org/10.1128/AEM.05548-11>
- Murthy, A., Li, Y., Peng, I., Reichelt, M., Katakam, A.K., Noubade, R., Roose-Girma, M., DeVoss, J., Diehl, L., Graham, R.R., van Lookeren Campagne, M., 2014. A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* 506, 456–462. <https://doi.org/10.1038/nature13044>
- Mylonaki, M., Langmead, L., Pantes, A., Johnson, F., Rampton, D.S., 2004. Enteric infection in relapse of inflammatory bowel disease: importance of microbiological examination of stool. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 775–778.
- Naaber, P., Smidt, I., Stsepetova, J., Brilene, T., Annuk, H., Mikelsaar, M., 2004. Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal Lactobacillus species. *J. Med. Microbiol.* 53, 551–554. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45595-0>
- Nabavi, S., Rafrat, M., Somi, M.H., Homayouni-Rad, A., Asghari-Jafarabadi, M., 2014. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Dairy Sci.* 97, 7386–7393. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8500>
- Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A.K., Lee, S.-J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., Fitzgerald, K.A., Ryter, S.W., Choi, A.M.K., 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 12, 222–230. <https://doi.org/10.1038/ni.1980>
- Nakamura, S., Kuda, T., An, C., Kanno, T., Takahashi, H., Kimura, B., 2012. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. *Anaerobe* 18, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.11.006>
- Natividad, J.M.M., Verdu, E.F., 2013. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* 69, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.007>

- Nerich, V., Monnet, E., Etienne, A., Louafi, S., Ramée, C., Rican, S., Weill, A., Vallier, N., Vanbockstael, V., Auleley, G.-R., Allemand, H., Carbonnel, F., 2006. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 218–226. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000206540.38834.8c>
- Neutra, M.R., Frey, A., Kraehenbuhl, J.P., 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86, 345–348.
- Neutra, M.R., Mantis, N.J., Kraehenbuhl, J.P., 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 2, 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/ni1101-1004>
- Nguyen, H.T.T., Dalmasso, G., Müller, S., Carrière, J., Seibold, F., Darfeuille-Michaud, A., 2014. Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* 146, 508–519. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.021>
- Nighot, P.K., Hu, C.-A.A., Ma, T.Y., 2015. Autophagy enhances intestinal epithelial tight junction barrier function by targeting claudin-2 protein degradation. *J. Biol. Chem.* 290, 7234–7246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597492>
- Nikolaus, S., Schreiber, S., 2007. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 133, 1670–1689. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.001>
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A., 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 29–35.
- Nimgampalle, M., Kuna, Y., 2017. Anti-Alzheimer Properties of Probiotic, *Lactobacillus plantarum* MTCC 1325 in Alzheimer's Disease induced Albino Rats. *J. Clin. Diagn. Res.* JCDR 11, KC01–KC05. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/26106.10428>
- Nista, E.C., Candelli, M., Cremonini, F., Cazzato, I.A., Zocco, M.A., Franceschi, F., Cammarota, G., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A., 2004. Bacillus clausii therapy to reduce side-effects of anti-Helicobacter pylori treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 1181–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.02274.x>
- Oak, S.J., Jha, R., 2018. The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1–9. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425977>
- Oelschlaeger, T.A., 2010. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 300, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005>
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H., 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606. <https://doi.org/10.1038/35079114>



- O'Hara, A.M., O'Regan, P., Fanning, A., O'Mahony, C., Macsharry, J., Lyons, A., Bienenstock, J., O'Mahony, L., Shanahan, F., 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 118, 202–215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02358.x>
- O'Hara, A.M., Shanahan, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Ohno, H., 2016. Intestinal M cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 159, 151–160. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv121>
- Okubo, H., Sakoda, H., Kushiyama, A., Fujishiro, M., Nakatsu, Y., Fukushima, T., Matsunaga, Y., Kamata, H., Asahara, T., Yoshida, Y., Chonan, O., Iwashita, M., Nishimura, F., Asano, T., 2013. *Lactobacillus casei* strain Shirota protects against nonalcoholic steatohepatitis development in a rodent model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305, G911-918. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00225.2013>
- Oláh, A., Belágyi, T., Issekutz, A., Gamal, M.E., Bengmark, S., 2002. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* 89, 1103–1107.
- Oliva, S., Di Nardo, G., Ferrari, F., Mallardo, S., Rossi, P., Patrizi, G., Cucchiara, S., Stronati, L., 2012. Randomised clinical trial: the effectiveness of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 327–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04939.x>
- Ooi, L.-G., Ahmad, R., Yuen, K.-H., Liong, M.-T., 2010. *Lactobacillus gasseri* [corrected] CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters. *J. Dairy Sci.* 93, 5048–5058. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3311>
- Orel, R., Kamhi Trop, T., 2014. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 11505–11524. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11505>
- Ortiz-Masiá, D., Cosín-Roger, J., Calatayud, S., Hernández, C., Alós, R., Hinojosa, J., Apostolova, N., Alvarez, A., Barrachina, M.D., 2014. Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol.* 7, 929–938. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.108>
- Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U.R., Timmis, K.N., Schreiber, S., 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 685–693.
- Otte, J.-M., Podolsky, D.K., 2004. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G613-626. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00341.2003>
- Pabst, O., 2012. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 821–832. <https://doi.org/10.1038/nri3322>

- Parassol, N., Freitas, M., Thoreux, K., Dalmaso, G., Bourdet-Sicard, R., Rampal, P., 2005. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Res. Microbiol.* 156, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.013>
- Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A., Roberts, R.G et al., 2007. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 39, 830–832. <https://doi.org/10.1038/ng2061>
- Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarrabayrouse, G., Machiels, K., Vermeire, S., Sokol, H., Guarner, F., Manichanh, C., 2017. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 66, 813–822. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313235>
- Patel, K.K., Miyoshi, H., Beatty, W.L., Head, R.D., Malvin, N.P., Cadwell, K., Guan, J.-L., Saitoh, T., Akira, S., Seglen, P.O., Dinauer, M.C., Virgin, H.W., Stappenbeck, T.S., 2013. Autophagy proteins control goblet cell function by potentiating reactive oxygen species production. *EMBO J.* 32, 3130–3144. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.233>
- Pearson, A.D., Eastham, E.J., Laker, M.F., Craft, A.W., Nelson, R., 1982. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* 285, 20–21.
- Pérez-Cano, F.J., Dong, H., Yaqoob, P., 2010. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* 215, 996–1004. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.01.004>
- Pessione, E., 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 86. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>
- Peters, C.P., Mjösberg, J.M., Bernink, J.H., Spits, H., 2016. Innate lymphoid cells in inflammatory bowel diseases. *Immunol. Lett.* 172, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.004>
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F., Meijer, A.J., Codogno, P., 2000. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 275, 992–998.
- Petnicki-Ocwieja, T., Hrcir, T., Liu, Y.-J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., Kobayashi, K.S., 2009. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15813–15818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907722106>
- Petrof, E.O., Kojima, K., Ropeleski, M.J., Musch, M.W., Tao, Y., De Simone, C., Chang, E.B., 2004. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 127, 1474–1487.

- Picornell, Y., Mei, L., Taylor, K., Yang, H., Targan, S.R., Rotter, J.I., 2007. TNFSF15 is an ethnic-specific IBD gene. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 1333–1338. <https://doi.org/10.1002/ibd.20223>
- Pitcher, M.C., Beatty, E.R., Cummings, J.H., 2000. The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut* 46, 64–72.
- Plantinga, T.S., Crisan, T.O., Oosting, M., Veerdonk, F.L. van de, Jong, D.J. de, Philpott, D.J., Meer, J.W.M. van der, Girardin, S.E., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., 2011. Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut* gut.2010.228908. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.228908>
- Plein, K., Hotz, J., 1993. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea—a pilot study. *Z. Gastroenterol.* 31, 129–134.
- Pochard, P., Gosset, P., Grangette, C., Andre, C., Tonnel, A.-B., Pestel, J., Mercenier, A., 2002. Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 617–623.
- Polson, H.E.J., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M.J., Tooze, S.A., 2010. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 6, 506–522. <https://doi.org/10.4161/auto.6.4.11863>
- Pott, J., Kabat, A.M., Maloy, K.J., 2018. Intestinal Epithelial Cell Autophagy Is Required to Protect against TNF-Induced Apoptosis during Chronic Colitis in Mice. *Cell Host Microbe* 23, 191-202.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.017>
- Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S., Coffman, R.L., 1994. Regulatory interactions between CD45RB<sup>high</sup> and CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* 179, 589–600.
- Prager, M., Buettner, J., Buening, C., 2015. Genes involved in the regulation of intestinal permeability and their role in ulcerative colitis. *J. Dig. Dis.* 16, 713–722. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12296>
- Prantera, C., Lochs, H., Grimaldi, M., Danese, S., Scribano, M.L., Gionchetti, P., Retic Study Group (Rifaximin-Eir Treatment in Crohn's Disease), 2012. Rifaximin-extended intestinal release induces remission in patients with moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology* 142, 473-481.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.032>
- Prantera, C., Scribano, M.L., Falasco, G., Andreoli, A., Luzi, C., 2002. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG. *Gut* 51, 405–409.

- Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K.L., Powell, R.M., MacDonald, T.T., Collins, J.E., 2005. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 85, 1139–1162. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700316>
- Preising, J., Philippe, D., Gleinser, M., Wei, H., Blum, S., Eikmanns, B.J., Niess, J.-H., Riedel, C.U., 2010. Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3048–3051. <https://doi.org/10.1128/AEM.03127-09>
- Prema, P., Smila, D., Palavesam, A., Immanuel, G., 2010. Production and Characterization of an Antifungal Compound (3-Phenyllactic Acid) Produced by *Lactobacillus plantarum* Strain. *Food Bioprocess Technol.* 3, 379–386. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0127-1>
- Proikas-Cezanne, T., Waddell, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A., Nordheim, A., 2004. WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* 23, 9314–9325. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208331>
- Prosberg, M., Bendtsen, F., Vind, I., Petersen, A.M., Gluud, L.L., 2016. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Scand. J. Gastroenterol.* 51, 1407–1415. <https://doi.org/10.1080/00365521.2016.1216587>
- Pulendran, B., Tang, H., Denning, T., 2008. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.10.009>
- Qamar, A., Aboudola, S., Warny, M., Michetti, P., Pothoulakis, C., LaMont, J.T., Kelly, C.P., 2001. *Saccharomyces boulardii* Stimulates Intestinal Immunoglobulin A Immune Response to Clostridium difficile Toxin A in Mice. *Infect. Immun.* 69, 2762–2765. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2762-2765.2001>
- Qin, H.-L., Zheng, J.-J., Tong, D.-N., Chen, W.-X., Fan, X.-B., Hang, X.-M., Jiang, Y.-Q., 2008. Effect of *Lactobacillus plantarum* enteral feeding on the gut permeability and septic complications in the patients with acute pancreatitis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 62, 923–930. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602792>
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, Shenghui, Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D et al., 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>
- Qualls, J.E., Kaplan, A.M., van Rooijen, N., Cohen, D.A., 2006. Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *J. Leukoc. Biol.* 80, 802–815. <https://doi.org/10.1189/jlb.1205734>
- Quévrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., et al., 2016. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65, 415–425. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307649>

- Quince, C., Lundin, E.E., Andreasson, A.N., Greco, D., Rafter, J., Talley, N.J., Agreus, L., Andersson, A.F., Engstrand, L., D'Amato, M., 2013. The impact of Crohn's disease genes on healthy human gut microbiota: a pilot study. *Gut* 62, 952–954. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304214>
- Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P.C., Klinder, A., O'Riordan, M., O'Sullivan, G.C., Pool-Zobel, B., Rechkemmer, G., Roller, M., Rowland, I., Salvadori, M., Thijs, H., Van Loo, J., Watzl, B., Collins, J.K., 2007. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 488–496. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.2.488>
- Rajilić-Stojanović, M., 2013. Function of the microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.006>
- Rajkumar, H., Mahmood, N., Kumar, M., Varikuti, S.R., Challa, H.R., Myakala, S.P., 2014. Effect of probiotic (VSL#3) and omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: a randomized, controlled trial. *Mediators Inflamm.* 2014, 348959. <https://doi.org/10.1155/2014/348959>
- Raleigh, D.R., Marchiando, A.M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., Turner, J.R., 2010. Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol. Biol. Cell* 21, 1200–1213. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-08-0734>
- Ramakrishna, B.S., 2013. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28 Suppl 4, 9–17. <https://doi.org/10.1111/jgh.12294>
- Raman, M., Ambalam, P., Kondepudi, K.K., Pithva, S., Kothari, C., Patel, A.T., Purama, R.K., Dave, J.M., Vyas, B.R.M., 2013. Potential of probiotics, prebiotics and synbiotics for management of colorectal cancer. *Gut Microbes* 4, 181–192. <https://doi.org/10.4161/gmic.23919>
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., Forsthuber, T.G., 2015. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
- Rautava, J., Pinnell, L.J., Vong, L., Akseer, N., Assa, A., Sherman, P.M., 2015. Oral microbiome composition changes in mouse models of colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30, 521–527. <https://doi.org/10.1111/jgh.12713>
- Reese, G.E., Nanidis, T., Borysiewicz, C., Yamamoto, T., Orchard, T., Tekkis, P.P., 2008. The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. *Int. J. Colorectal Dis.* 23, 1213–1221. <https://doi.org/10.1007/s00384-008-0542-9>
- Reggiori, F., Shintani, T., Nair, U., Klionsky, D.J., 2005. Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* 1, 101–109.
- Regueiro, M., Kip, K.E., Cheung, O., Hegazi, R.A., Plevy, S., 2005. Cigarette smoking and age at diagnosis of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 11, 42–47.

- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., Sisirak, V., 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 163–183. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101345>
- Riis, L., Vind, I., Vermeire, S., Wolters, F., Katsanos, K., Politi, P., Freitas, J., Mouzas, I.A., O'Morain, C., Ruiz-Ochoa, V., Odes, S., Binder, V., Munkholm, P., Moum, B., Stockbrügger, R., Langholz, E., European Collaborative Study Group on Inflammatory Bowel Disease, 2007. The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 24–32. <https://doi.org/10.1002/ibd.20047>
- Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P et al., 2007. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet.* 39, 596–604. <https://doi.org/10.1038/ng2032>
- Robinson, M., 1998. Medical therapy of inflammatory bowel disease for the 21st century. *Eur. J. Surg. Suppl. Acta Chir. Suppl.* 90–98.
- Rocha, J.D.B., Schlossmacher, M.G., Philpott, D.J., 2015. LRRK2 and Nod2 promote lysozyme sorting in Paneth cells. *Nat. Immunol.* 16, 898–900. <https://doi.org/10.1038/ni.3255>
- Rong, J., Zheng, H., Liu, M., Hu, X., Wang, T., Zhang, X., Jin, F., Wang, L., 2015. Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BMC Microbiol.* 15, 196. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0525-2>
- Rook, G. a. W., Brunet, L.R., 2005. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 54, 317–320. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.053785>
- Russell, P., 2009. Physiological and Functional Properties of Probiotics (2008) - by International Dairy Federation. *Int. J. Dairy Technol.* 62, 290–291. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00488.x>
- Ryan, K.A., Jayaraman, T., Daly, P., Canchaya, C., Curran, S., Fang, F., Quigley, E.M., O'Toole, P.W., 2008. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 269–274.
- Ryu, S.-H., Park, J.-H., Choi, S.-Y., Jeon, H.-Y., Park, J.-I., Kim, J.-Y., Ham, S.-H., Choi, Y.-K., 2016. The Probiotic *Lactobacillus* Prevents *Citrobacter rodentium*-Induced Murine Colitis in a TLR2-Dependent Manner. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1333–1340. <https://doi.org/10.4014/jmb.1602.02004>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197–215.
- Saez-Lara, M.J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., Gil, A., 2015. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *BioMed Res. Int.* 2015, 505878. <https://doi.org/10.1155/2015/505878>

- Saitoh, T., Akira, S., 2016. Regulation of inflammasomes by autophagy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.009>
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T., Akira, S., 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature* 456, 264–268. <https://doi.org/10.1038/nature07383>
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S., 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* 11, 4131–4142.
- Salem, M., Nielsen, O.H., Nys, K., Yazdanyar, S., Seidelin, J.B., 2015. Impact of T300A Variant of *ATG16L1* on Antibacterial Response, Risk of Culture Positive Infections, and Clinical Course of Crohn's Disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 6, e122. <https://doi.org/10.1038/ctg.2015.47>
- Sales-Campos, H., Basso, P.J., Alves, V.B.F., Fonseca, M.T.C., Bonfá, G., Nardini, V., Cardoso, C.R.B., 2015. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 48, 96–107. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143774>
- Salim, S.Y., Söderholm, J.D., 2011. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 362–381. <https://doi.org/10.1002/ibd.21403>
- Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Bevins, C.L., Williams, C.B., Bos, N.A., 2010. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* 11, 76–83. <https://doi.org/10.1038/ni.1825>
- Salzman, N.H., Underwood, M.A., Bevins, C.L., 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin. Immunol.* 19, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.04.002>
- Sancho, E., Battle, E., Clevers, H., 2003. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 763–770.
- Sand, S.L., Nissen-Meyer, J., Sand, O., Haug, T.M., 2013. Plantaricin A, a cationic peptide produced by *Lactobacillus plantarum*, permeabilizes eukaryotic cell membranes by a mechanism dependent on negative surface charge linked to glycosylated membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.001>
- Sartor, R.B., 2005. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21, 44–50.
- Sartor, R.B., 2004. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 126, 1620–1633.
- Sartor, R.B., 2000. New therapeutic approaches to Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 342, 1664–1666. <https://doi.org/10.1056/NEJM200006013422210>

- Satish Kumar, C.S.V., Kondal Reddy, K., Boobalan, G., Gopala Reddy, A., Sudha Rani Chowdhary, C.H., Vinoth, A., Jayakanth, K., Srinivasa Rao, G., 2017. Immunomodulatory effects of *Bifidobacterium bifidum* 231 on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Res. Vet. Sci.* 110, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.10.010>
- Satish Kumar, C.S.V., Kondal Reddy, K., Reddy, A.G., Vinoth, A., Ch, S.R.C., Boobalan, G., Rao, G.S., 2015. Protective effect of *Lactobacillus plantarum* 21, a probiotic on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Int. Immunopharmacol.* 25, 504–510. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.02.026>
- Scaldaferri, F., Gerardi, V., Lopetuso, L.R., Del Zompo, F., Mangiola, F., Boškoski, I., Bruno, G., Petito, V., Laterza, L., Cammarota, G., Gaetani, E., Sgambato, A., Gasbarrini, A., 2013. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *BioMed Res. Int.* 2013, 435268. <https://doi.org/10.1155/2013/435268>
- Scanlan, P.D., Shanahan, F., O'Mahony, C., Marchesi, J.R., 2006. Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3980–3988. <https://doi.org/10.1128/JCM.00312-06>
- Schaafsma, G., Meuling, W.J., van Dokkum, W., Bouley, C., 1998. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52, 436–440.
- Schaubeck, M., Clavel, T., Calasan, J., Lagkouvardos, I., Haange, S.B., Jehmlich, N., Basic, M., Dupont, A., Hornef, M., von Bergen, M., Bleich, A., Haller, D., 2016. Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* 65, 225–237. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309333>
- Schlee, M., Harder, J., Köten, B., Stange, E.F., Wehkamp, J., Fellermann, K., 2008. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin. Exp. Immunol.* 151, 528–535. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03587.x>
- Schultz, M., Timmer, A., Herfarth, H.H., Sartor, R.B., Vanderhoof, J.A., Rath, H.C., 2004. *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol.* 4, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-4-5>
- Schultz, M., Veltkamp, C., Dieleman, L.A., Grenther, W.B., Wyrick, P.B., Tonkonogy, S.L., Sartor, R.B., 2002. *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 8, 71–80.
- Schulzke, J.D., Gitter, A.H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, S., Fromm, M., 2005. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1669, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.01.008>
- Schwab, C., Berry, D., Rauch, I., Rennisch, I., Ramesmayer, J., Hainzl, E., Heider, S., Decker, T., Kenner, L., Müller, M., Strobl, B., Wagner, M., Schleper, C., Loy, A., Urich, T., 2014. Longitudinal study of murine microbiota activity and interactions with the host during acute inflammation and recovery. *ISME J.* 8, 1101–1114. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.223>



- Schwabe, R.F., Jobin, C., 2013. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 800–812. <https://doi.org/10.1038/nrc3610>
- Seale, J.V., Millar, M., 2013. Probiotics: a new frontier for infection control. *J. Hosp. Infect.* 84, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.01.005>
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., Doré, J., 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237–242.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 14, e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Senok, A.C., Ismaeel, A.Y., Botta, G.A., 2005. Probiotics: facts and myths. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 958–966. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01228.x>
- Serino, M., Blasco-Baque, V., Nicolas, S., Burcelin, R., 2014. Far from the eyes, close to the heart: dysbiosis of gut microbiota and cardiovascular consequences. *Curr. Cardiol. Rep.* 16, 540. <https://doi.org/10.1007/s11886-014-0540-1>
- Seth, A., Yan, F., Polk, D.B., Rao, R.K., 2008. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G1060-1069. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00202.2007>
- Sha, S., Xu, B., Kong, X., Wei, N., Liu, J., Wu, K., 2014. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 with different courses and different doses on intestinal inflammation in murine model of colitis. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* 63, 873–883. <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0761-1>
- Shaaban, S.Y., El Gendy, Y.G., Mehanna, N.S., El-Senousy, W.M., El-Feki, H.S.A., Saad, K., El-Asheer, O.M., 2017. The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutr. Neurosci.* 1–6. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1347746>
- Shah, N.P., 2007. Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J., Rheology and Structure of Fermented Milk* 17, 1262–1277. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014>
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., Dikic, I., 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* 20, 21–30. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.72>
- Shanahan, F., 2013. The colonic microbiota in health and disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 29, 49–54. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32835a3493>

- Shang, L., Fukata, M., Thirunarayanan, N., Martin, A.P., Arnaboldi, P., Maussang, D., Berin, C., Unkeless, J.C., Mayer, L., Abreu, M.T., Lira, S.A., 2008. Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology* 135, 529–538. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.020>
- Sharma, P., Tomar, S.K., Goswami, P., Sangwan, V., Singh, R., 2014. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Res. Int.* 57, 176–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.025>
- Shi, C.-Z., Chen, H.-Q., Liang, Y., Xia, Y., Yang, Y.-Z., Yang, J., Zhang, J.-D., Wang, S.-H., Liu, J., Qin, H.-L., 2014. Combined probiotic bacteria promotes intestinal epithelial barrier function in interleukin-10-gene-deficient mice. *World J. Gastroenterol.* 20, 4636–4647. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i16.4636>
- Singh, V.P., Sharma, J., Babu, S., Rizwanulla, null, Singla, A., 2013. Role of probiotics in health and disease: a review. *J. Pak. Med. Assoc.* 63, 253–257.
- Sipos, F., Molnár, B., Zágoni, T., Berczi, L., Tulassay, Z., 2005. Growth in epithelial cell proliferation and apoptosis correlates specifically to the inflammation activity of inflammatory bowel diseases: ulcerative colitis shows specific p53- and EGFR expression alterations. *Dis. Colon Rectum* 48, 775–786. <https://doi.org/10.1007/s10350-004-0831-5>
- Sivieri, K., Morales, M.L.V., Adorno, M.A.T., Sakamoto, I.K., Saad, S.M.I., Rossi, E.A., 2013. *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 improved “gut health” in the SHIME reactor. *BMC Gastroenterol.* 13, 100. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-13-100>
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., Kenne, L., 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7554–7557.
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., Garrett, W.S., 2013. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341, 569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H.M., Doré, J., Marseau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Sokol, H., Seksik, P., 2010. The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 327–331. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e328339536b>

- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., Doré, J., 2009. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 1183–1189. <https://doi.org/10.1002/ibd.20903>
- Solberg, I.C., Vatn, M.H., Høie, O., Stray, N., Sauar, J., Jahnsen, J., Moum, B., Lygren, I., IBSEN Study Group, 2007. Clinical course in Crohn's disease: results of a Norwegian population-based ten-year follow-up study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 5, 1430–1438. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.09.002>
- Sommer, F., Bäckhed, F., 2013. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Sood, A., Midha, V., Makharia, G.K., Ahuja, V., Singal, D., Goswami, P., Tandon, R.K., 2009. The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 7, 1202–1209, 1209.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.07.016>
- Souza, É.L., Elian, S.D., Paula, L.M., Garcia, C.C., Vieira, A.T., Teixeira, M.M., Arantes, R.M., Nicoli, J.R., Martins, F.S., 2016. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. *J. Med. Microbiol.* 65, 201–210. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000222>
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E., 2013. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>
- Srutkova, D., Schwarzer, M., Hudcovic, T., Zakostelska, Z., Drab, V., Spanova, A., Rittich, B., Kozakova, H., Schabussova, I., 2015. *Bifidobacterium longum* CCM 7952 Promotes Epithelial Barrier Function and Prevents Acute DSS-Induced Colitis in Strictly Strain-Specific Manner. *PloS One* 10, e0134050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134050>
- Srůtková, D., Spanova, A., Spano, M., Dráb, V., Schwarzer, M., Kozaková, H., Rittich, B., 2011. Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. *J. Microbiol. Methods* 87, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.014>
- Stange, E.F., Travis, S.P.L., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinkas, L., Geboes, K., Barakauskiene, A., Villanacci, V., Von Herbay, A., Warren, B.F., Gasche, C., Tilg, H., Schreiber, S.W., Schölmerich, J., Reinisch, W., European Crohn's and Colitis Organisation, 2006. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 55 Suppl 1, i1-15. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.081950a>

- Stange, E.F., Travis, S.P.L., Vermeire, S., Reinisch, W., Geboes, K., Barakauskiene, A., Feakins, R., Fléjou, J.F., Herfarth, H., Hommes, D.W., Kupcinskas, L., Lakatos, P.L., Mantzaris, G.J., Schreiber, S., Villanacci, V., Warren, B.F., European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO), 2008. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J. Crohns Colitis* 2, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2007.11.001>
- Steed, H., Macfarlane, G.T., Blackett, K.L., Bahrami, B., Reynolds, N., Walsh, S.V., Cummings, J.H., Macfarlane, S., 2010. Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 32, 872–883. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04417.x>
- Stetinova, V., Smetanova, L., Kvetina, J., Svoboda, Z., Zidek, Z., Tlaskalova-Hogenova, H., 2010. Caco-2 cell monolayer integrity and effect of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 components. *Neuro Endocrinol. Lett.* 31 Suppl 2, 51–56.
- Strisciuglio, C., Duijvestein, M., Verhaar, A.P., Vos, A.C.W., van den Brink, G.R., Hommes, D.W., Wildenberg, M.E., 2013. Impaired autophagy leads to abnormal dendritic cell-epithelial cell interactions. *J. Crohns Colitis* 7, 534–541. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.08.009>
- Su, M.S., Schlicht, S., Gänzle, M.G., 2011. Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. *Microb. Cell Factories* 10 Suppl 1, S8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S8>
- Suares, N.C., Ford, A.C., 2011. Prevalence of, and risk factors for, chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 1582–1591; quiz 1581, 1592. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.164>
- Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Van Assche, G., Geboes, K., Ceuppens, J.L., Rutgeerts, P., 2002. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 2000–2004. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05914.x>
- Suez, J., Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiardes, S., Zur, M et al., 2018. Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell* 174, 1406–1423.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.047>
- Sun, Q., Fan, J., Billiar, T.R., Scott, M.J., 2017. Inflammasome and autophagy regulation - a two-way street. *Mol. Med. Camb. Mass* 23. <https://doi.org/10.2119/molmed.2017.00077>
- Suzuki, T., 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 631–659. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>
- Suzuki, T., Yoshida, S., Hara, H., 2008. Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. *Br. J. Nutr.* 100, 297–305. <https://doi.org/10.1017/S0007114508888733>

- Suzuki, T., Yoshinaga, N., Tanabe, S., 2011. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* 286, 31263–31271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238147>
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Herber, A., 2009. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 60 Suppl 6, 61–71.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Verstraelen, H., Osowska, S., Doerffel, Y., 2008. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology* 135, 568–579. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.017>
- Swidsinski, A., Sydora, B.C., Doerffel, Y., Loening-Baucke, V., Vanechoutte, M., Lupicki, M., Scholze, J., Lochs, H., Dieleman, L.A., 2007. Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 963–970. <https://doi.org/10.1002/ibd.20163>
- Szajewska, H., Kołodziej, M., 2015. Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 42, 793–801. <https://doi.org/10.1111/apt.13344>
- Szajewska, H., Ruszczyński, M., Radzikowski, A., 2006. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Pediatr.* 149, 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.04.053>
- Szebeni, B., Veres, G., Dezsöfi, A., Rusai, K., Vannay, A., Mraz, M., Majorova, E., Arató, A., 2008. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 151, 34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03531.x>
- Tadmor, T., Zhang, Y., Cho, H.-M., Podack, E.R., Rosenblatt, J.D., 2011. The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 60, 609–619. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-0972-z>
- Takáts, S., Nagy, P., Varga, Á., Piracs, K., Kárpáti, M., Varga, K., Kovács, A.L., Hegedűs, K., Juhász, G., 2013. Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 201, 531–539. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211160>
- Takáts, S., Piracs, K., Nagy, P., Varga, Á., Kárpáti, M., Hegedűs, K., Kramer, H., Kovács, A.L., Sass, M., Juhász, G., 2014. Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell* 25, 1338–1354. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-08-0449>
- Talero, E., Garcia-Maurino, S., Motilva, V., 2014. Melatonin, autophagy and intestinal bowel disease. *Curr. Pharm. Des.* 20, 4816–4827.
- Tamasauskiene, L., Sitkauskiene, B., 2018. Role of Th22 and IL-22 in pathogenesis of allergic airway diseases: Pro-inflammatory or anti-inflammatory effect? *Pediatr. Neonatol.* 59, 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.11.020>

- Taylor, A.L., Hale, J., Wiltschut, J., Lehmann, H., Dunstan, J.A., Prescott, S.L., 2006. Effects of probiotic supplementation for the first 6 months of life on allergen- and vaccine-specific immune responses. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 36, 1227–1235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02553.x>
- Teshima, C.W., Goodman, K.J., El-Kalla, M., Turk, S., El-Matary, W., Valcheva, R., Danchak, R., Gordon, M., Ho, P., Mullins, A., Wong, D., Kao, D., Meddings, J., Huynh, H., Dieleman, L.A., 2017. Increased Intestinal Permeability in Relatives of Patients With Crohn's Disease Is Not Associated With Small Bowel Ulcerations. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 15, 1413-1418.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.02.028>
- Testro, A.G., Visvanathan, K., 2009. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 943–954. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05854.x>
- Thia, K.T., Loftus, E.V., Sandborn, W.J., Yang, S.-K., 2008. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 3167–3182. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2008.02158.x>
- Thomas, M.R., Litin, S.C., Osmon, D.R., Corr, A.P., Weaver, A.L., Lohse, C.M., 2001. Lack of effect of Lactobacillus GG on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebo-controlled trial. *Mayo Clin. Proc.* 76, 883–889. <https://doi.org/10.4065/76.9.883>
- Thomas, S., Baumgart, D.C., 2012. Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology* 20, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0104-6>
- Tian, C., Kabi, A., McDonald, C., 2013. Role of Autophagy-Related Genes in the Pathology of Inflammatory Bowel Disease, in: *ELS. American Cancer Society.* <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0025006>
- Todoriki, K., Mukai, T., Sato, S., Toba, T., 2001. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by Lactobacillus strains. *J. Appl. Microbiol.* 91, 154–159.
- Tonucci, L.B., Olbrich Dos Santos, K.M., Licursi de Oliveira, L., Rocha Ribeiro, S.M., Duarte Martino, H.S., 2017. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 36, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.11.011>
- Toumi, R., Abdelouhab, K., Raza, H., Soufli, I., Raissi-Kerboua, D., Djeraba, Z., Touil-Boukoffa, C., 2013. Beneficial role of the probiotic mixture Ultrabiotique on maintaining the integrity of intestinal mucosal barrier in DSS-induced experimental colitis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35, 403–409. <https://doi.org/10.3109/08923973.2013.790413>
- Trapp, C.L., Chang, C.C., Halpern, G.M., Keen, C.L., Gershwin, M.E., 1993. The influence of chronic yogurt consumption on populations of young and elderly adults. *Int. J. Immunother.* 9, 53–64.

- Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I.G., Allaoui, A., Jones, N.L., Nuñez, G., Girardin, S.E., Philpott, D.J., 2010. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 11, 55–62. <https://doi.org/10.1038/ni.1823>
- Tremelling, M., Berzuini, C., Massey, D., Bredin, F., Price, C., Dawson, C., Bingham, S.A., Parkes, M., 2008. Contribution of TNFSF15 gene variants to Crohn's disease susceptibility confirmed in UK population. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 733–737. <https://doi.org/10.1002/ibd.20399>
- Tsai, C.-C., Lin, P.-P., Hsieh, Y.-M., 2008. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. *Anaerobe* 14, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.11.003>
- Tschurtschenthaler, M., Adolph, T.E., Ashcroft, J.W., Niederreiter, L., Bharti, R., Saveljeva, S., Bhattacharyya, J., Flak, M.B., Shih, D.Q., Fuhler, G.M., Parkes, M., Kohno, K., Iwawaki, T., Janneke van der Woude, C., Harding, H.P., Smith, A.M., Peppelenbosch, M.P., Targan, S.R., Ron, D., Rosenstiel, P., Blumberg, R.S., Kaser, A., 2017. Defective ATG16L1-mediated removal of IRE1 $\alpha$  drives Crohn's disease-like ileitis. *J. Exp. Med.* 214, 401–422. <https://doi.org/10.1084/jem.20160791>
- Turchet, P., Laurenzano, M., Auboiron, S., Antoine, J.M., 2003. Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J. Nutr. Health Aging* 7, 75–77.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799–809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
- Tursi, A., Brandimarte, G., Giorgetti, G.M., Forti, G., Modeo, M.E., Gigliobianco, A., 2004. Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 10, PI126-131.
- Tursi, A., Brandimarte, G., Papa, A., Giglio, A., Elisei, W., Giorgetti, G.M., Forti, G., Morini, S., Hassan, C., Pistoia, M.A., Modeo, M.E., Rodino', S., D'Amico, T., Sebkova, L., Sacca', N., Di Giulio, E., Lizza, F., Imeneo, M., Larussa, T., Di Rosa, S., Annese, V., Danese, S., Gasbarrini, A., 2010. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2218–2227. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.218>
- Ugarte, M.B., Guglielmotti, D., Giraffa, G., Reinheimer, J., Hynes, E., 2006. Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard Argentinean cheeses: genetic characterization and resistance to biological barriers. *J. Food Prot.* 69, 2983–2991.

- Ukabam, S.O., Clamp, J.R., Cooper, B.T., 1983. Abnormal small intestinal permeability to sugars in patients with Crohn's disease of the terminal ileum and colon. *Digestion* 27, 70–74. <https://doi.org/10.1159/000198932>
- Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S., 2004. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.* 279, 44785–44794. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406563200>
- Van Assche, G., Dignass, A., Panes, J., Beaugerie, L., Karagiannis, J., Allez, M., Ochsenkühn, T., Orchard, T., Rogler, G., Louis, E., Kupcinskas, L., Mantzaris, G., Travis, S., Stange, E., European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO), 2010. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J. Crohns Colitis* 4, 7–27. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2009.12.003>
- van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., Einerhand, A.W.C., 2006a. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117–129. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., Einerhand, A.W.C., 2006b. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117–129. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>
- Van Gossum, A., Dewit, O., Louis, E., de Hertogh, G., Baert, F., Fontaine, F., DeVos, M., Enslin, M., Paintin, M., Franchimont, D., 2007. Multicenter randomized-controlled clinical trial of probiotics (*Lactobacillus johnsonii*, LA1) on early endoscopic recurrence of Crohn's disease after ileo-caecal resection. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 135–142. <https://doi.org/10.1002/ibd.20063>
- Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 403–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404>
- van Minnen, L.P., Timmerman, H.M., Lutgendorff, F., Verheem, A., Harmsen, W., Konstantinov, S.R., Smidt, H., Visser, M.R., Rijkers, G.T., Gooszen, H.G., Akkermans, L.M.A., 2007. Modification of intestinal flora with multispecies probiotics reduces bacterial translocation and improves clinical course in a rat model of acute pancreatitis. *Surgery* 141, 470–480. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.007>
- Vanderhoof, J.A., Whitney, D.B., Antonson, D.L., Hanner, T.L., Lupo, J.V., Young, R.J., 1999. *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J. Pediatr.* 135, 564–568.



- Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Vael, C., Klare, I., Romond, M.-B., Entenza, J.M., Moreillon, P., Wind, R.D., Knol, J., Wiertz, E., Pot, B., Vaughan, E.E., Kahlmeter, G., Goossens, H., 2008. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends Food Sci. Technol.* 19, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.013>
- Varma, P., Dinesh, K.R., Menon, K.K., Biswas, R., 2010. *Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens. *J. Food Sci.* 75, M546-551. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01818.x>
- Vermeire, S., Van Assche, G., Rutgeerts, P., 2006. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 55, 426–431. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.069476>
- Victoria, C.R., Sassak, L.Y., Nunes, H.R. de C., 2009. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq. Gastroenterol.* 46, 20–25.
- Viljanen, M., Savilahti, E., Haahtela, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., Tuure, T., Kuitunen, M., 2005. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 60, 494–500. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00514.x>
- Villena, J., Vizoso-Pinto, M.G., Kitazawa, H., 2016. Intestinal Innate Antiviral Immunity and Immunobiotics: Beneficial Effects against Rotavirus Infection. *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00563>
- Vissers, Y.M., Snel, J., Zuurendonk, P.F., Smit, B.A., Wichers, H.J., Savelkoul, H.F.J., 2010. Differential effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* strains on cytokine induction in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 60–70. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00662.x>
- Vizoso-Pinto, M.G., Saavedra, L., Hebert, E.M., Raya Tonetti, F., Albarracín, L., Alvarez, S., Kitazawa, H., Villena, J., 2017. Draft Genome Sequence of Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* Strain IBL027, a Potential Adjuvant for Mucosal Vaccine Development. *Genome Announc.* 5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01268-17>
- Vlainić, J.V., Šuran, J., Vlainić, T., Vukorep, A.L., 2016. Probiotics as an Adjuvant Therapy in Major Depressive Disorder. *Curr. Neuropharmacol.* 14, 952–958.
- Voedisch, S., Koenecke, C., David, S., Herbrand, H., Förster, R., Rhen, M., Pabst, O., 2009. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infect. Immun.* 77, 3170–3180. <https://doi.org/10.1128/IAI.00272-09>
- Wallace, J.L., MacNaughton, W.K., Morris, G.P., Beck, P.L., 1989. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 96, 29–36.

- Walters, W.A., Xu, Z., Knight, R., 2014. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett.* 588, 4223–4233. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.039>
- Wang, J., Tang, H., Zhang, C., Zhao, Y., Derrien, M., Rocher, E., van-Hylckama Vlieg, J.E.T., Strissel, K., Zhao, L., Obin, M., Shen, J., 2015. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.99>
- Wang, K.-Y., Li, S.-N., Liu, C.-S., Perng, D.-S., Su, Y.-C., Wu, D.-C., Jan, C.-M., Lai, C.-H., Wang, T.-N., Wang, W.-M., 2004. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 737–741. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.3.737>
- Weber, C.R., Nalle, S.C., Tretiakova, M., Rubin, D.T., Turner, J.R., 2008. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 88, 1110–1120. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.78>
- Weber, C.R., Raleigh, D.R., Su, L., Shen, L., Sullivan, E.A., Wang, Y., Turner, J.R., 2010. Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J. Biol. Chem.* 285, 12037–12046. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.064808>
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, J.M., Stange, E.F., 2004. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect. Immun.* 72, 5750–5758. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5750-5758.2004>
- Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R.W., Chu, H., Lima, H., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E.F., Bevins, C.L., 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18129–18134. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505256102>
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., Elazar, Z., 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 29, 1792–1802. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.74>
- Welcker, K., Martin, A., Kölle, P., Siebeck, M., Gross, M., 2004. Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. *Eur. J. Med. Res.* 9, 456–460.
- Wenus, C., Goll, R., Loken, E.B., Biong, A.S., Halvorsen, D.S., Florholmen, J., 2008. Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink. *Eur. J. Clin. Nutr.* 62, 299–301. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602718>
- West, P.A., Hewitt, J.H., Murphy, O.M., 1979. Influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J. Appl. Bacteriol.* 46, 269–277.

- West, R.L., van der Woude, C.J., Hansen, B.E., Felt-Bersma, R.J.F., van Tilburg, A.J.P., Drapers, J. a. G., Kuipers, E.J., 2004. Clinical and endosonographic effect of ciprofloxacin on the treatment of perianal fistulae in Crohn's disease with infliximab: a double-blind placebo-controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 1329–1336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.02247.x>
- Wikoff, W.R., Anfora, A.T., Liu, J., Schultz, P.G., Lesley, S.A., Peters, E.C., Siuzdak, G., 2009. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3698–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>
- Willing, B., Halfvarson, J., Dicksved, J., Rosenquist, M., Järnerot, G., Engstrand, L., Tysk, C., Jansson, J.K., 2009. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 653–660. <https://doi.org/10.1002/ibd.20783>
- Willing, B.P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A.F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G., Tysk, C., Jansson, J.K., Engstrand, L., 2010. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 139, 1844-1854.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.049>
- Willing, B.P., Russell, S.L., Finlay, B.B., 2011. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 233–243. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2536>
- Wittkopf, N., Günther, C., Martini, E., Waldner, M., Amann, K.U., Neurath, M.F., Becker, C., 2012. Lack of intestinal epithelial atg7 affects paneth cell granule formation but does not compromise immune homeostasis in the gut. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 278059. <https://doi.org/10.1155/2012/278059>
- Wlodarska, M., Thaïss, C.A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.-P., Brown, E.M., Frankel, G., Levy, M., Katz, M.N., Philbrick, W.M., Elinav, E., Finlay, B.B., Flavell, R.A., 2014. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* 156, 1045–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.026>
- Woodard, G.A., Encarnacion, B., Downey, J.R., Peraza, J., Chong, K., Hernandez-Boussard, T., Morton, J.M., 2009. Probiotics improve outcomes after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a prospective randomized trial. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 13, 1198–1204. <https://doi.org/10.1007/s11605-009-0891-x>
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F.D., Lewis, J.D., 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>
- Wu, H.-J., Wu, E., 2012. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes* 3, 4–14. <https://doi.org/10.4161/gmic.19320>

- Wu, S., Zhang, Y.-G., Lu, R., Xia, Y., Zhou, D., Petrof, E.O., Claud, E.C., Chen, D., Chang, E.B., Carmeliet, G., Sun, J., 2015. Intestinal epithelial vitamin D receptor deletion leads to defective autophagy in colitis. *Gut* 64, 1082–1094. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307436>
- Wu, X., Vallance, B.A., Boyer, L., Bergstrom, K.S.B., Walker, J., Madsen, K., O’Kusky, J.R., Buchan, A.M., Jacobson, K., 2008. *Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G295-306. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00173.2007>
- Wu, Y., Wang, Yang, Zou, H., Wang, B., Sun, Q., Fu, A., Wang, Yuanyuan, Wang, Yibing, Xu, X., Li, W., 2017. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 Induces Autophagy to Protect against Pathogens in Macrophages. *Front. Microbiol.* 8, 469. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00469>
- Wu, Y., Zhu, C., Chen, Zhuang, Chen, Zhongjian, Zhang, W., Ma, X., Wang, L., Yang, X., Jiang, Z., 2016. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in intestinal porcine epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 172, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.03.005>
- Wyatt, J., Vogelsang, H., Hübl, W., Waldhöer, T., Lochs, H., 1993. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn’s disease. *Lancet Lond. Engl.* 341, 1437–1439.
- Xie, Z., Klionsky, D.J., 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102–1109. <https://doi.org/10.1038/ncb1007-1102>
- Xilouri, M., Stefanis, L., 2016. Chaperone mediated autophagy in aging: Starve to prosper. *Ageing Res. Rev.* 32, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.07.001>
- Yacyshyn, B.R., Meddings, J.B., 1995. CD45RO expression on circulating CD19+ B cells in Crohn’s disease correlates with intestinal permeability. *Gastroenterology* 108, 132–137.
- Yadav, H., Lee, J.-H., Lloyd, J., Walter, P., Rane, S.G., 2013. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *J. Biol. Chem.* 288, 25088–25097. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.452516>
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., Tashiro, Y., 1998. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* 23, 33–42.
- Yamazaki, K., McGovern, D., Ragoussis, J., Paolucci, M., Butler, H., Jewell, D., Cardon, L., Takazoe, M., Tanaka, T., Ichimori, T., Saito, S., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Lathrop, M., Nakamura, Y., 2005. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn’s disease. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3499–3506. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi379>

- Yan, F., Polk, D.B., 2002. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 50959–50965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207050200>
- Yang, S.-K., Hong, M., Zhao, W., Jung, Y., Baek, J., Tayebi, N., Kim, K.M., Ye, B.D., Kim, K.-J et al., 2014. Genome-wide association study of Crohn's disease in Koreans revealed three new susceptibility loci and common attributes of genetic susceptibility across ethnic populations. *Gut* 63, 80–87. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305193>
- Yang, S.-K., Lim, J., Chang, H.-S., Lee, I., Li, Y., Liu, J., Song, K., 2008. Association of TNFSF15 with Crohn's disease in Koreans. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1437–1442. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01752.x>
- Yang, X., Fu, Y., Liu, J., Ren, H.-Y., 2013. Impact of probiotics on toll-like receptor 4 expression in an experimental model of ulcerative colitis. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* 33, 661–665. <https://doi.org/10.1007/s11596-013-1177-9>
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2009. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335, 1–32. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_1)
- Yao, Y., Vent-Schmidt, J., McGeough, M.D., Wong, M., Hoffman, H.M., Steiner, T.S., Levings, M.K., 2015. Tr1 Cells, but Not Foxp3+ Regulatory T Cells, Suppress NLRP3 Inflammasome Activation via an IL-10-Dependent Mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 195, 488–497. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403225>
- Yoda, K., Miyazawa, K., Hosoda, M., Hiramatsu, M., Yan, F., He, F., 2014. *Lactobacillus* GG-fermented milk prevents DSS-induced colitis and regulates intestinal epithelial homeostasis through activation of epidermal growth factor receptor. *Eur. J. Nutr.* 53, 105–115. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0506-x>
- Yoon, J.Y., Cha, J.M., Oh, J.K., Tan, P.L., Kim, S.H., Kwak, M.S., Jeon, J.W., Shin, H.P., 2018. Probiotics Ameliorate Stool Consistency in Patients with Chronic Constipation: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Dig. Dis. Sci.* <https://doi.org/10.1007/s10620-018-5139-8>
- Yu, J., Wang, W.H., Menghe, B.L.G., Jiri, M.T., Wang, H.M., Liu, W.J., Bao, Q.H., Lu, Q., Zhang, J.C., Wang, F., Xu, H.Y., Sun, T.S., Zhang, H.P., 2011. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *J. Dairy Sci.* 94, 3229–3241. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3727>
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa, G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28, 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>
- Zarrati, M., Salehi, E., Nourijelyani, K., Mofid, V., Zadeh, M.J.H., Najafi, F., Ghafлатi, Z., Bidad, K., Chamari, M., Karimi, M., Shidfar, F., 2014. Effects of probiotic yogurt on fat distribution and gene expression of proinflammatory factors in peripheral blood mononuclear cells in overweight and obese people with or without weight-loss diet. *J. Am. Coll. Nutr.* 33, 417–425. <https://doi.org/10.1080/07315724.2013.874937>

- Zarrati, M., Shidfar, F., Nourijelyani, K., Mofid, V., Hossein zadeh-Attar, M.J., Bidad, K., Najafi, F., Gheflati, Z., Chamari, M., Salehi, E., 2013. *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium* BB12, and *Lactobacillus casei* DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *BioFactors Oxf. Engl.* 39, 633–643. <https://doi.org/10.1002/biof.1128>
- Zaslloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zaylaa, M., Al Kassaa, I., Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Desramaut, J., Dabboussi, F., Pot, B., Grangette, C., 2018. Probiotics in IBD: Combining in vitro and in vivo models for selecting strains with both anti-inflammatory potential as well as a capacity to restore the gut epithelial barrier. *J. Funct. Foods* 47, 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.029>
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.-D., 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56, 61–72. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>
- Zelaya, H., Alvarez, S., Kitazawa, H., Villena, J., 2016. Respiratory Antiviral Immunity and Immunobiotics: Beneficial Effects on Inflammation-Coagulation Interaction during Influenza Virus Infection. *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00633>
- Zhang, H., Zheng, L., Chen, J., Fukata, M., Ichikawa, R., Shih, D.Q., Zhang, X., 2017a. The protection role of Atg16l1 in CD11c+dendritic cells in murine colitis. *Immunobiology* 222, 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.03.002>
- Zhang, H., Zheng, L., McGovern, D.P.B., Hamill, A.M., Ichikawa, R., Kanazawa, Y., Luu, J., Kumagai, K., Cilluffo, M., Fukata, M., Targan, S.R., Underhill, D.M., Zhang, X., Shih, D.Q., 2017b. Myeloid ATG16L1 Facilitates Host-Bacteria Interactions in Maintaining Intestinal Homeostasis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 198, 2133–2146. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601293>
- Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., Neu, J., 2005. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 135, 1752–1756. <https://doi.org/10.1093/jn/135.7.1752>
- Zhang, W., Zhu, Y.-H., Yang, G.-Y., Liu, X., Xia, B., Hu, X., Su, J.-H., Wang, J.-F., 2017. *Lactobacillus rhamnosus* GG Affects Microbiota and Suppresses Autophagy in the Intestines of Pigs Challenged with *Salmonella Infantis*. *Front. Microbiol.* 8, 2705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02705>
- Zhang, Y.-Z., Li, Y.-Y., 2014. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 20, 91–99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>

- Zheng, B., van Bergenhenegouwen, J., Overbeek, S., van de Kant, H.J.G., Garssen, J., Folkerts, G., Vos, P., Morgan, M.E., Kraneveld, A.D., 2014. *Bifidobacterium breve* attenuates murine dextran sodium sulfate-induced colitis and increases regulatory T cell responses. *PLoS One* 9, e95441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095441>
- Zheng, J.J., Zhu, X.S., Huangfu, Z., Gao, Z.X., Guo, Z.R., Wang, Z., 2005. Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin. J. Dig. Dis.* 6, 175–181. <https://doi.org/10.1111/j.1443-9573.2005.00227.x>
- Zhernakova, A., van Diemen, C.C., Wijmenga, C., 2009. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat. Rev. Genet.* 10, 43–55. <https://doi.org/10.1038/nrg2489>
- Zhong, Y., Huang, C.-Y., He, T., Harmsen, H.M.J., 2006. [Effect of probiotics and yogurt on colonic microflora in subjects with lactose intolerance]. *Wei Sheng Yan Jiu* 35, 587–591.
- Zhong, Y., Kinio, A., Saleh, M., 2013. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front. Immunol.* 4, 333. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00333>
- Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliah, E., Satpathy, A.T., Friedlander, G., Mack, M., Shpigel, N., Boneca, I.G., Murphy, K.M., Shakhar, G., Halpern, Z., Jung, S., 2012. Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* 37, 1076–1090. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.026>
- Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashirdes, S., Kotler, E., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Briker, R.B.-Z., Federici, S., Cohen, Y., Linevsky, R., Rothschild, D., Moor, A.E., Ben-Moshe, S., Harmelin, A., Itzkovitz, S., Maharshak, N., Shibolet, O., Shapiro, H., Pevsner-Fischer, M., Sharon, I., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E., 2018. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell* 174, 1388–1405.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041>
- Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., Tsakalidou, E., 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.013>
- Zuo, L., Yuan, K.-T., Yu, L., Meng, Q.-H., Chung, P.C.-K., Yang, D.-H., 2014. *Bifidobacterium infantis* attenuates colitis by regulating T cell subset responses. *World J. Gastroenterol.* 20, 18316–18329. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18316>
- Zyrek, A.A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., Schmidt, M.A., 2007. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell. Microbiol.* 9, 804–816. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00836.x>

# ***ANNEXE***



## **Publication N°2**

***In vitro* and *in vivo* blocking of autophagy abolished the anti-inflammatory capacities of selected probiotic strains**

**Mazen Zaylaa, Jeanne Alard, Imad Al Kassaa, Veronique Peucelle, Denise Boutillier, Jérémy Desramaut, Fouad Dabboussi, Bruno Pot and Corinne Grangette**

**En préparation pour soumission à  
Cellular Physiology and Biochemistry**

## ***In vitro* and *in vivo* blocking of autophagy abolished the anti-inflammatory capacities of selected probiotic strains**

Mazen Zaylaa<sup>1,2</sup>, Jeanne Alard<sup>1</sup>, Imad Al Kassaa<sup>2</sup>, Veronique Peucelle<sup>1</sup>, Denise Boutillier<sup>1</sup>, Jérémy Desramaut<sup>1</sup>, Fouad Dabboussi<sup>2</sup>, Bruno Pot<sup>1</sup> and Corinne Grangette<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL, Center for Infection and Immunity of Lille, 59000 Lille, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Doctoral School of Sciences and Technology, Faculty of Public Health, Lebanese University, Tripoli, Lebanon

\*Corresponding author:

Corinne Grangette

Lactic Acid Bacteria and Mucosal Immunity

Center for Infection and Immunity of Lille

Institut Pasteur of Lille

1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France

Tel : +33 3 20 87 11 88

Fax: +33 3 20 87 11 88 ;

E-mail: Corinne.grangette@ibl.cnrs.fr,

ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2398-44>

**Keywords: Probiotics, inflammatory bowel diseases, autophagy**

**Short title (<80 characters): Probiotics, IBD and autophagy**

## **Abstract**

**Background/objectives:** Deregulation of the normal interplay between the genetics and immune system of the host on the one hand, and the gut microbiota and environmental factors on the other hand, is known to be associated with the development of inflammatory bowel disease (IBD). A growing number of genetic studies provided strong evidence that autophagy machinery affects several aspects of a mucosal immune response, including intracellular bacterial killing, antimicrobial peptide secretion, pro-inflammatory cytokine production and antigen presentation. Therefore autophagy is considered to play a key role in the physio-pathogenesis of Crohn's disease. Probiotics may exhibit many therapeutic properties, including anti-inflammatory abilities; however, the medical use in IBD is still scarce. It remains therefore important to better understand their molecular mechanisms.

**Methods:** Bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were used to unravel the capacity of the bacteria to activate autophagy. The impact of the *in vitro* blockage of autophagy using 3-methyl adenine or bafilomycin was evaluated using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and ELISA analysis of cytokine secretion. The role of autophagy in the anti-inflammatory capacities of the strains was evaluated using an acute trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced murine model of colitis. The impact of BMDC was evaluated by adoptive transfer.

**Results:** We showed that selected lactobacilli and bifidobacteria are able to induce autophagy activation in BMDCs. We demonstrated *in vitro* that blocking the autophagy process abolished the capacity of the strains to induce the release of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) while it exacerbated the secretion of interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ). We confirmed in a TNBS colitis model that autophagy is involved in the protective capacity of these selected strains, highlighting the role of dendritic cells in this process.

**Conclusions:** We propose that autophagy is a novel mechanism through which probiotics exhibit their regulatory capacities.

## Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) encompassing the main clinical forms Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is characterized by chronic inflammation of the gut mucosa, disruption of the gut barrier function and a dysbiotic microbiota [1]. Indeed, the gut microbiota of IBD patients is characterized by a low microbial diversity, a reduced abundance of bifidobacteria, lactobacilli [2] and *Faecalibacterium prausnitzii* [3], while there is a higher abundance of pathobionts such as adherent/invasive *Escherichia coli* [4]. Moreover, abnormal immune responses are elicited against the luminal bacteria in genetically susceptible individuals [5]. Genome-wide association studies (GWAS) have revealed numerous polymorphisms, more than 200 IBD susceptibility loci being identified so far [6]. Many of these genes are related to innate immunity, mucosal barrier function and bacterial recognition. Notably NOD2 which senses muramyl dipeptides, the conserved motif of the peptidoglycan of both gram-negative and gram-positive bacteria, has been largely shown as the main susceptibility gene associated with CD [7]. Recent studies have also identified polymorphisms of genes involved in autophagy, such as *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1) [8], *IRGM* (immunity related guanosine triphosphatase) [9] and *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) [10].

Autophagy is an intracellular degradation pathway which regulates the turnover of cellular proteins and organelles that play essential roles in cellular homeostasis [11]. The autophagic process starts with the formation of the phagophore, a double membrane compartment which engulfs a portion of the cytoplasm that contains the molecules or particles to be degraded, and closes off to form the autophagosome that finally leads to fusion lysosomes and the degradation of the cargo by the lysosomal hydrolases. This process is highly complex and orchestrated by numerous proteins, including more than 40 autophagy-related proteins (ATG) [12]. The formation of the autophagosome is regulated mainly by the ATG5-ATG12 complex, then stabilized by ATG16L1, which allows the modification of the microtubule-associated light chain 3 (LC3-I), initially present in the cytoplasm, to a phosphatidylethanolamine (PE)-conjugated membrane-bound form (LC3-II), which is finally recruited by the autophagosomes [13]. The engulfment of the cargo, closure of the autophagosome and fusion with the lysosomal compartment is orchestrated by LC3, which is widely used as a marker of autophagy activation [14]. In the gut, autophagy has been reported

to mediate critical functions in innate and adaptive immunity, such as antigen presentation by dendritic cells (DC) [15], cytokine secretion by macrophages [16] and antimicrobial peptide secretion by Paneth cells [17]. Autophagy plays also an essential role during infection by degrading intracellular pathogens through xenophagy [18]. Interestingly, NOD2 is known to be involved in the autophagy process, since it is able to recruit ATG16L1 into the plasma membrane, at the bacterial entry site [19]. As such, NOD2 and ATG16L1 deficiencies have been shown to affect bacterial clearance *in vitro*, favoring the survival of intracellular bacteria, and explaining the proliferation of certain pathobionts, and observed pro-inflammatory cytokine secretions [20,21]. It has been reported that autophagic flux is impaired in the damaged mucosa of IBD patients, as compared to non-damaged tissue, suggesting that, in addition to genetic components, inflammation is regulating this process [22]. In parallel, strong evidences indicate that autophagy regulates inflammatory responses, notably by controlling the inflammasome, explaining that compromised autophagy causes aberrant inflammatory responses that can lead to the development of IBD [23]. Deregulation of DC function has been reported in DCs from CD patients carrying NOD2 or Atg16L1 risk variants, and which are defective in autophagy induction, bacterial trafficking and antigen presentation [20]. Disruption of Atg16L1 in CD11c<sup>+</sup> DCs significantly increased the severity of the inflammation induced by dextran sodium sulfate (DSS) [24]. Recently, an inhibitory role of autophagy in the immunogenic maturation of DCs and a positive role in their tolerogenic maturation has been suggested [25]. Finally, Kabat *et al.* recently showed that autophagy defects can alter the balance of different types of T-cells in the gut, leading to inflammation in the intestine. By specific ablation of *atg16L1* in FoxP3<sup>+</sup> T-regulatory cells in mice, they have demonstrated that autophagy promotes the survival of these cells in the gut [26]. The autophagy machinery in IBD represents therefore a complex pathway that contributes to the pathogenesis.

Current treatments of IBD, including biological therapy, remain largely ineffective and associated with adverse health consequences, and the disease continues to cause substantial morbidity and to affect patient's quality of life. The development of alternative therapies using natural products is therefore gaining worldwide attention [27]. Targeting microbiota dysbiosis and impaired gut functions linked to IBD may constitute a target of choice in the treatment of chronic inflammatory diseases. In this context, manipulation of the gut ecosystem using

beneficial microbes, namely probiotics, has been a major focus of research during the last decade. However their recommendation for IBD is still rather scarce. In order to select more effective strains it is thus important to better define the underlying mechanism of action and screen for targeted functional properties. We previously showed that the anti-inflammatory capacities of lactobacilli and bifidobacteria are strain-specific and that their *in vitro* immunomodulatory capacities strongly correlate with their protective capacities in experimental colitis models [28,29]. Moreover, we highlighted the crucial role of DCs in this probiotic functionality [30]. In the present study, we evaluated both *in vitro* and *in vivo* the role of autophagy in the immunoregulatory capacities of selected probiotic strains.

## **Material and Methods**

### *Bacterial strains and culture conditions*

Bacterial strains evaluated in the present study are listed in Table 1. Lactobacilli were grown in de Man Rogosa and Sharpe broth (MRS, Difco, Detroit, USA) overnight at 37 °C under microaerophilic conditions. Bifidobacteria were cultured overnight in MRS broth, supplemented with 0.1% (w/v) L-cysteine hydrochloride (Sigma, USA) under anaerobic conditions using anaerobic generator packs (GENbaganaer, Biomérieux, France). For *in vitro* experiments, bacteria were washed twice with sterile phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2), and aliquoted at  $10^9$  CFU/ml in PBS supplemented with 20% (v/v) glycerol and stored at -80 °C. For *in vivo* studies, freshly grown bacteria were adjusted to  $5 \times 10^9$  CFU/ml in gavage buffer (200 mM NaHCO<sub>3</sub> containing 1% glucose).

### *In vitro stimulation of human PBMCs*

PBMCs were isolated from human blood obtained as described previously [31], by authorized staff, from five healthy donors upon approved agreement (signed consent). Briefly, after a Ficoll gradient centrifugation (Pharmacia, Stockholm, Sweden), mononuclear cells were collected, washed twice with PBS and adjusted to  $2 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, Scotland), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, Scotland), 1mM glutamine and 150 µg/ml gentamycin. Cells ( $10^6$  cells/well) were plated in 48-well cell culture plates and were pre-incubated for 1 hour at 37 °C in the presence (or not)

of 3-methyl adenine (3-MA, Sigma, 5 mM) or bafilomycin A1 (Sigma, 100 nM). PBMCs were subsequently stimulated with bacteria at a bacteria/cells ratio of 10:1. PBS with 20% glycerol was used as negative control. After 20h of stimulation at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>, supernatants were collected, clarified by centrifugation and stored at -20 °C for cytokine analysis. The cytokines IL-10 and IL-1β were measured by ELISA using the ELISA MAX<sup>TM</sup> standard set (BioLegend, San Diego, USA) and the DuoSet kit (R&D System, USA), respectively, according to the manufacturer's instructions.

#### *Bone marrow-derived dendritic cell preparation (BMDCs)*

BMDCs were generated from the bone marrow precursors isolated from femurs and tibias of BALB/c mice as described by Lutz *et al* [32], with minor modifications. Briefly, after red cell lysis using 0.142M NH<sub>4</sub>Cl /0.04X PBS buffer, the cells were grown at 2 x 10<sup>6</sup> cells in 10 ml of IMDM medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium Gibco) supplemented with 10% inactivated FCS (fetal calf serum, Gibco, Scotland), 50 μM β-mercaptoethanol, 1 mM glutamine, 50 μg / ml gentamycin, and 10% of supernatant from a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-expressing cell line (GM-CSF transfected J588 myeloma cell line). Freshly prepared medium was added every three days. BMDCs were used between day 10 and 13 of culture (maximum of CD11c expression as checked by FACS analysis).

#### *BMDC stimulation*

BMDCs (0.75 x 10<sup>6</sup> cells/ well) were plated in 24-well cell culture plates and were pre-incubated for 1 hour at 37 °C in the presence or not of 3-MA (Sigma, 5 mM). After the pre-treatment, BMDCs were stimulated with bacteria at a bacteria/cells ratio of 10:1 in the presence of 150 μg/ml gentamycin. After 20h, culture supernatants were collected, clarified by centrifugation and stored at -20 °C for IL-1β measurement by ELISA using the DuoSet kits (R&D System, USA), according to the manufacturer's instructions.

For *in vivo* cell transfer, the cells were grown at 5 x 10<sup>6</sup> cells in a Petri dish in 10 ml of complete IMDM and were pre-incubated for 1 hour at 37 °C in the presence (or not) of 3-MA (sigma, 5mM). BMDCs were then stimulated with bacteria at a bacteria/cells ratio of 10:1 in the presence of 150 ug/ml gentamycin, washed 3 times in PBS and resuspended at 2 x 10<sup>6</sup> cells in 200 μl of PBS. No remaining viable

bacteria were detected in the cell suspensions, as checked by plating on MRS medium.

#### *Western-Blot analysis*

The transformation of LC3 from the cytosolic form (LC3-I) to the lipidated form (LC3-II) was followed, by western blot, as a molecular marker of autophagic vacuoles [33]. BMDCs were plated in 24-well cell culture plates at  $1 \times 10^6$  cells/well and were pre-incubated for 1 hour at 37 °C in the presence (or not) of bafilomycin A1 (Sigma, 100 nM). BMDCs were then stimulated with the bacteria at a bacteria/cells ratio of 10:1 for 4h. PBS with 20% glycerol was used as negative control and rapamycin (10 µg / ml) as positive control. The cells were washed with PBS and then lysed with a lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 1% of Triton 100X and 0.1% SDS), supplemented with a protein inhibitor (Protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The cell lysates were harvested and centrifuged at 12,000 x g for 15 min at 4 °C. The supernatants were recovered and mixed with loading buffer (Laemmli buffer) containing 60 mM Tris pH 6.8; 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue and then heated for 15 min at 75°C. The migration was carried out for 2 h in a 15% acryl/bis acryl gel in 0.025M Tris buffer / 0.192M glycine / 0.1% SDS at 90V. After migration, the proteins were transferred to a PVDF membrane (Polyvinylidene Fluoride, Hybond-p; Bio-Rad, Hercules CA, USA) in a 20 mM Tris / 150 mM glycine / 20% methanol buffer for 2 h at 100V. Membranes were treated with blocking buffer containing 10 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 and 3% BSA (Bovine Serum Albumin) for 1 h at 25°C and incubated overnight at 4 °C with a rabbit anti-LC3 (Novus, 1:3000, Littleton, CO, USA) or mouse anti-α-tubulin antibody (Invitrogen, 1:5000, Camarillo, CA USA) in blocking buffer. After washing for 15 min in PBS / 0.01% Tween, they were incubated for 45 min at 25 °C with a secondary anti-mouse or anti-rabbit IgG conjugated with HRP (Promega, 1:5000, Madison, WI, USA) in PBS / Tween 0.01%. Membranes were washed as described and incubated with ECL detection reagent (ECL Plus, Western blotting reagent, Amersham, GE Healthare, Buckinghamshire, UK). The light emitted following the chemiluminescence reaction was detected and analyzed by the Imager LAS-3000 system (Fujifilm, Japan) and the band intensity was quantified using the Multi Gauge V3.0 software (Fujifilm, Japan).



### *Immunofluorescence and confocal microscopy analysis*

BMDCs were grown on coverslips in 24-well plates at  $0.2 \times 10^6$  cells/well. They were stimulated as described above and fixed with Paraformaldehyde (4% PFA in PBS) for 15 min. After washing with PBS, the cells were permeabilized with 10% TRITON X100 solution for 5 min and blocked for 30 min with pure fetal calf serum. The cells were then incubated for 1 hour with anti-mouse LC3 primary antibody (Anti-LC3 PM036, MBL, 1:100) in fetal calf serum. After 3 washes for 5 min in PBS, the coverslips were incubated for 45 minutes with the fluorochrome-coupled anti-rabbit secondary antibody (Alexa fluor 488 conjugated antibody, Invitrogen, 1:500) in fetal calf serum. After 3 washings in PBS, nuclei were labeled with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, DNA marker emitting at 359/461 nm, Invitrogen, 1:1000) in PBS for 5 min. Cells were then washed with PBS and the slides were mounted on glass slides using 7  $\mu$ l of Dako Fluorescence Mounting Medium (Carpinteria, CA, USA). Confocal microscopy was performed using a confocal laser scanning microscope (Zeiss, LSM 880).

### *Experimental TNBS-induced colitis model and study design*

Female BALB/c ByJ mice (7-8 weeks old) were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). Before experimentation, animals were provided a one week acclimation period. Mice were randomly divided and maintained under specific pathogen-free conditions in a controlled environment (temperature of 22° C, 12 h/12 h light/dark cycle and with ad libitum access to food and water).

Protective capacities of probiotics were evaluated *in vivo* using a standardized murine model of acute colitis, induced by the administration of TNBS [29]. Mice (n= 10 per group) received daily live bacteria by intra-gastric administration ( $5 \times 10^8$  CFU/day/mice), in 100  $\mu$ l gavage buffer, or gavage buffer alone (control healthy mice or TNBS-treated control mice) for six consecutive days before colitis induction and 1 day after the TNBS administration. The blockage of autophagy was performed by intraperitoneal administration of the 3-MA inhibitor (Sigma, 10 mg/kg) concomitantly with the bacterial treatment (day 1 to day 6). At day 5, anesthetized mice were intrarectally administered with 50  $\mu$ l of a solution of TNBS (Sigma-Aldrich, France) dissolved in 0.9% NaCl/ethanol solution (50/50 v/v), at a dose of 105 mg/kg, while control healthy mice received only 50% EtOH. The mice were sacrificed 48h after the induction of colitis. Macroscopic inflammatory scores were determined blindly

according to the Wallace scoring method [34] by assessing the intensity of inflammation and the extent of lesions (thickening of the intestinal wall, intensity ulceration and colonic necrosis). Blood was collected by retro-orbital sampling and the plasma was recovered by centrifugation and stored at -80° C for the determination of IL-6 and IL-1 $\beta$  concentration by ELISA using the DuoSet kits (R&D System, Minneapolis, MN, USA) as recommended by the manufacturer. Histological analysis was carried out on May-Grünwald Giemsa stained 5  $\mu$ m tissue sections from colon samples (5 sections per mice) fixed in 4% formalin, embedded in paraffin. The histological scores were determined according to the Ameho scoring method [35] by evaluating the intensity of the inflammatory infiltrate, the presence of edema, ulcerations and cellular necrosis. A part of the colon corresponding to the inflamed region was recovered and cleaned from fecal material and stored in RNA-later® (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA) at - 80° C until RNA extraction and real-time RT-PCR analysis.

The protective effect of untreated or *L. rhamnosus* IPL A21.1-pulsed DCs in presence or absence of 3-MA was also evaluated by intra-peritoneal administration of 2 x 10<sup>6</sup> cells, 2h before TNBS-colitis induction as previously described [30] and study was performed as described above.

#### RNA extraction and qRT-PCR

Tissue samples were homogenized using Lysing Matrix D (MP Bio, Solon, OH, USA). Total RNA was extracted using Macherey-Nagel NucleoSpin RNAII isolation kit according to the manufacturer's recommendation (Macherey-Nagel, Germany). Quantity and quality of RNA were checked using nanodrop (260/280nm, 260/230nm), showing a purity ratio 260/280 higher than 1.95 in all samples. Reverse transcription of total RNA (1  $\mu$ g) was performed using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using SYBR green as dye (Applied Biosystems™). Briefly 2.5  $\mu$ l of cDNA (corresponding to 25 ng of RNA) was amplified using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™) in the presence of 200 nM specific primers in a final volume of 10  $\mu$ l using the QuantStudio® 3D Digital PCR System (Applied Biosystems™). Relative mRNA levels [2<sup>- $\Delta$ ( $\Delta$ CT)] were determined by comparing 1) the PCR cycle thresholds (Ct) for</sup>

the gene of interest and the housekeeping gene Actb ( $\Delta\text{Ct}$ ) and 2) the  $\Delta\text{Ct}$  values for treated and untreated animal groups ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ).

### *Statistical analysis*

GraphPad Prism was employed for graph preparation and statistical evaluation. Differences between groups were assessed using ANOVA, followed by nonparametric Mann-Whitney test. Data with  $p$  values  $\leq 0.05$  were considered to be significant.

## **Results**

### *Bacterial strains induced autophagy in murine bone marrow-derived dendritic cells (BMDC)*

We first evaluated the ability of the selected strains to activate the autophagy process using murine DCs. BMDCs from BALB/c mice were stimulated with bacteria at a bacteria/cells ratio of 10:1 for 4 h and the autophagy induction was followed by immuno-labelling followed by confocal laser scanning analysis which allowed to determine the number of autophagosomes in the form of LC3-labelled puncta. As shown in Fig 1A, cells treated with rapamycin for 4 h significantly ( $p < 0.001$ ) increased LC3 puncta, as compared to untreated cells. All the strains were able to induce significant formation of autophagosomes, but the activation was higher after *L. gasseri* IPL A6.33 and *B. longum* CMUL CXL 001 ( $p < 0.001$ ) stimulation, while *L. reuteri* 100-23 was the weakest inducer ( $p=0.497$ ). This was confirmed by measuring the ratio of LC3-II to LC3-I after western blotting analysis. As showed in Fig. 1B, significant up-regulation of LC3-II protein expression and an increase in the ratio of LC3-II/LC3-I was observed in cells treated with the autophagy activator rapamycin, as compared to the basal level observed for untreated cells ( $p < 0.01$ ). A slight basal activation could also be detected with the strains. This activation was significant for *B. bifidum* IPL A7.31 and *L. gasseri* IPL A6.33 ( $p < 0.05$ ), and was increased when cells were pre-treated with bafilomycin. The latter blocks the fusion between autophagosomes and lysosomes, confirming the capacity of probiotic strains to activate autophagy.

### *Inhibition of autophagy enhanced IL-1 $\beta$ production and decreased IL-10 secretion in human immune cells and murine BMDCs stimulated with bacteria*

We have previously observed that lactic acid bacteria (LAB) have differential immunomodulatory effects on PBMCs, which correlated well with their protective capacity in murine colitis [29]. We recently highlighted, as an example, the potent anti-inflammatory ability of *L. rhamnosus* IPL A2.21 [36]. In order to evaluate the role of autophagy in the immuno-modulation capacities of these selected bacteria, we used two different pharmacological inhibitors: the 3-MA, a PI3K inhibitor which blocks the autophagosome formation [37] and bafilomycin A1, a potent inhibitor of the lysosomal proton pump V-ATPases which inhibits autophagic flux by preventing the acidification of endosomes and lysosomes [38]. PBMCs were pre-treated (or not) with the inhibitors for 1h and subsequently stimulated by the different strains for 20 h and cytokine release was measured. All the strains tested induced high levels of IL-10 (Fig. 2A), *L. rhamnosus* IPL A2.21, *L. gasseri* IPL A6.33 and *L. reuteri* 100-23 at the top, and *L. gasseri* CMUL057 and *L. acidophilus* CMUL067 somewhat lower, as previously observed [36]. The capacity of the strains to induce IL-1 $\beta$  was also strain-dependent and was inversely correlated with their respective IL-10 inducing capacity, *L. gasseri* CMUL057 and *L. acidophilus* CMUL067 being the highest inducers. The two autophagy inhibitors were able to significantly ( $-p < 0.05$  or  $0.01$ ) limit the IL-10 production induced by all the strains, with a more pronounced effect of the bafilomycin, which completely blocked IL-10 induction. Conversely, the bacterial induction of IL-1 $\beta$  was significantly enhanced when PBMCs were pre-treated with both inhibitors. This effect was also greater with bafilomycin, especially for strains that induced moderate basal levels of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$  or  $0.01$ ). The role of autophagy in the immunomodulation capacity of the bacterial strains was also confirmed using murine BMDCs. Since low amounts of IL-10 were induced after bacterial stimulation, it was not possible to highlight an effect in the presence of inhibitors (data not shown), however, the blockage of autophagy using 3-MA, increased probiotic-induced secretion of IL-1 $\beta$ , as also observed on PBMCs (Fig. 2B).

*In vivo inhibition of autophagy limited the protective effects of selected strains in an acute TNBS-induced murine model of colitis*

Although the impact of deficient autophagy activation is well documented in colitis, there is a lack of knowledge on the importance of sustained activation of autophagy in this disease. We therefore evaluated the role of the autophagy process in the protective capacity of selected probiotic strains. A well-established model of acute colitis, induced by TNBS (Fig. 3A) in BALB/c mice was used. Two strains, *L. rhamnosus* A2.21 and *L. acidophilus* CMUL067, were selected based on the protective activity, previously reported to be mediated by respectively an anti-inflammatory ability and a strengthening of the epithelial barrier [36]. Bacteria were administered daily by oral gavage and the blockage of autophagy was performed by intraperitoneal injection (IP) of 3-MA, concomitantly with the bacterial administration. As expected, TNBS induced a strong inflammation, depicted by an average weight loss of 16.7% (Fig. 3B), highly significant macroscopic (Wallace score of 7.3,  $p < 0.01$ ) and histological scores (Ameho score of 5.6,  $p < 0.01$ ) and a strong increase of the IL-6 plasmatic concentration ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3B- F), as compared to untreated control animals. This was further confirmed by a strong colonic expression of pro-inflammatory genes encoding for IL-6, TNF- $\alpha$  and CXCL2 ( $p < 0.01$ ), 48 h after colitis induction (Fig. 3G), again compared to untreated control mice.

The two selected strains were able to dampen the acute colitis, resulting in significant decreases of weight loss and both macroscopic ( $p < 0.001$ ) and histological scores of inflammation ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3B, C and E), in comparison to mice receiving gavage buffer only (TNBS control group). The protective ability of the strains was further confirmed by a significant decrease in the level of plasmatic IL-6 ( $p < 0.01$ ) and in the expression of pro-inflammatory genes ( $p < 0.05$  or  $0.01$ ) (Fig. 3F-G). In mice receiving only TNBS as well as the *L. acidophilus* strain, administration of 3-MA did not significantly reduce the loss of body weight, the macroscopic and histological scores of inflammation, nor the plasmatic IL-6 concentration (Figure 3B, C and E), while it significantly ( $p < 0.05$  or  $0.01$ ) limited the protective effects induced by the *L. rhamnosus* A2.21 strain for all the parameters tested. This observation suggested that the blockage of the autophagy process prevented the anti-inflammatory effects induced by this *L. rhamnosus* strain. Interestingly, the daily injection of 3-MA

led to an increased level of plasmatic IL-1 $\beta$  in all groups of mice, even with the animals that received the protective *L. rhamnosus* IPL A2.21 strain (Fig. 3F).

While TNBS treatment induced a significant decrease in *zo1* and *occludin* expression ( $p < 0.01$ ) in control mice, the administration of selected strains could significantly restore the expression of genes encoding these tight junction (TJ) proteins. In comparison to control TNBS-treated mice, a higher expression level was obtained with *L. acidophilus*, as reported already previously [36]. The administration of 3-MA did not significantly affect the capacity of the strains to induce the expression of TJ genes.

*The protective role of probiotic-treated BMDC is abolished after pharmacological inhibition of autophagy*

We previously demonstrated that the adoptive transfer of BMDCs pulsed *in vitro* with selected lactobacilli were able to achieve *in vivo* protection against colitis in mice [30]. In the present study, we confirmed that a single IP administration of BMDCs pulsed with *L. rhamnosus* IPL A2.21 rescued mice from TNBS-induced colitis, while untreated DCs had no effect. The protective ability of bacteria-treated BMDCs was characterized by a significant reduction of the weight loss ( $p < 0.01$ ), the macroscopic and histological scores of inflammation ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) and a strong and significant decrease of plasmatic IL-6 secretion ( $p < 0.01$ ), while these parameters were not significantly changed in mice receiving untreated BMDCs (Fig. 4B-E). This was confirmed by measuring the expression of inflammatory genes *il6* and *cxcl2* (Fig. 4G). We therefore evaluated the role of autophagy in the immune-regulatory capacities of *L. rhamnosus*-treated DCs by stimulating the BMDCs with the bacteria in the presence or absence of 3-MA before the adoptive transfer. *L. rhamnosus*-pulsed DCs, in the presence of 3-MA, were no longer able to protect mice from colitis. Body weight loss, macroscopic and histological scores of inflammation, plasmatic IL-6 levels and expression of pro-inflammatory genes were not significantly different from those obtained for the control TNBS-treated group or the group receiving the BMDCs treated with 3-MA alone (Figure 4B- G).

## Discussion

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic immune disorder of unclear etiology, characterized by disruption of the epithelial barrier function and by chronic inflammation of the mucosa [1]. Multiple factors play a role in the pathogenesis, including diet, genetic susceptibility, immunological and environmental factors, including the gut microbiota. GWAS have revealed numerous polymorphisms, providing growing evidence for a defective autophagy process in the pathogenesis of IBD, particularly in CD patients. Impaired autophagy has been observed in the damaged mucosa of IBD patients and in the mucosa of TNBS-treated mice [39]. Despite significant advances, current therapies remain inefficient in treating IBD and they predominantly target pathological immune responses rather than the potential causal factors. Given the growing interest in the role of autophagy in regulating gut homeostasis, it has become an attractive target for exploring the impact of therapeutic approaches that address the autophagy process. Promising results have been obtained by the administration of sirolimus (rapamycin) which led to a sustained improvement of disease symptoms in refractory CD patients, including reduced inflammation and improved endoscopic appearance [40]. Stimulation of autophagy using different pharmacological agents such as rapamycin, betanin or trehalose has also been shown to prevent the impaired autophagic flux induced by TNBS and to ameliorate murine colitis through the inhibition of inflammation [41]. However, current therapies are often associated with adverse side effects. As a consequence, research attention is now focusing on alternative therapies; preferably based on natural and safe products. The capacity of probiotics to improve gut health has received considerable scientific interests for more than a century and accumulating evidence recently supported their positive impact in the control of gut inflammation. Probiotics can exhibit their protective effects through numerous different mechanisms, notably the modulation of the gut microbiota, the improvement of the gut barrier function and the modulation of the mucosal immune system, keeping pathogens away from the intestinal mucosa surface. In the present study we investigated the possibility that activation of autophagy might be involved in the anti-inflammatory capacities of selected lactobacilli and bifidobacteria that we previously highlighted to be protective in a TNBS-induced murine model of colitis [36].

### *Selection of the strains*

The detection of LC3-labelled puncta by confocal microscopy allowed us to demonstrate that the seven selected strains were able to activate autophagy, except one *L. reuteri* strain. This was confirmed using western blot, measuring the conversion of LC3I to LC3II. Notably the use of bafilomycin which blocks the fusion between autophagosomes and lysosomes, allowed us to clearly confirm autophagy activation, as we observed a greater accumulation of LC3-labelled autophagosomes. Few studies have so far evaluated the capacity of probiotics or commensal bacteria to activate autophagy. Lin *et al.* have reported that four different bifidobacteria were able to trigger autophagy in the epithelial IEC-18 rat cell line [42]. However, they did not correlate this ability to functional properties. A bioactive lysate derived from a *L. fermentum* strain has also been shown *in vitro* to activate autophagy in the human hepatoma cell line HepG2, correlated to an *in vitro* protective effect against drug-induced toxicity [43]. The activation of autophagy was also reported with *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 in the murine macrophage RAW264.7 cell line and was shown to be involved in the antibacterial activity of the probiotic which promoted the elimination of an *E. coli* strain [44]. Conversely, the *L. rhamnosus* GG strain was shown to inhibit *Salmonella enterica* serovar infantis-induced autophagy, which, in turn suppressed intestinal epithelial cell death and limited *Salmonella* translocation in LGG-pre-treated pigs [45]. In the same way, supernatant from a *B. bifidum* strain inhibited LPS-induced autophagy in IEC-18 cells and alleviated LPS-induced intestinal epithelial cell injury [46]. All these data could indicate that probiotic-induced autophagy reactions may be different according to the strains used, the host cells tested or the different pathophysiological situations, albeit useful as a novel mechanism through which they are able to promote and maintain gut homeostasis.

### *The role of autophagy in the regulatory capacities of probiotics*

Autophagy is emerging as one of the critical effector mechanisms of the gut immune homeostasis, influencing antigen presentation by DCs [20], the inhibition of IL-1 $\beta$  signaling [47], the regulation of inflammasome activation [16,48] and Paneth cell function [17], among others [49]. We therefore evaluated the role of autophagy in the anti-inflammatory capacities of our strains. We showed that blocking the autophagy machinery using 3-MA or bafilomycin, respectively decreased or



abandoned the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 on PBMCs, following stimulation with different lactobacilli and bifidobacteria. Conversely, the blockage of autophagy led to a large increase of IL-1 $\beta$  secretion, notably with strains that induced low or moderate basal levels of this pro-inflammatory cytokine (*B. bifidum* IPL A7.31, *B. longum* CMUL CXL 001, *L. rhamnosus* IPL A2.21, *L. gasseri* IPL A6.33 and *L. reuteri* 100-23). Also here the effect was more pronounced with bafilomycin. A similar effect was also observed using BMDCs. Saitoh *et al* reported for the first time that, through an inflammasome-dependent pathway, *in vitro* LPS-induced IL-1 $\beta$  production was enhanced in Atg16L1 deficient murine macrophages. The levels of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 were also significantly elevated in the sera of DSS-treated Atg16L1-deficient mice in comparison to the levels in the wild-type counterparts [16]. The authors confirmed by 3-MA administration, that blockage of autophagy increased the levels of IL-1 $\beta$  in serum and worsened the survival rate of mice treated with DSS, suggesting that autophagy protects mice from massive inflammation during colitis. This has been confirmed in human PBMCs, showing that the inhibition of autophagy increased IL-1 $\beta$  production after toll-like receptor-2 (TLR2) or TLR4 stimulation, albeit through an inflammasome-independent pathway [50].

#### *Potential role on the regulation of inflammasome*

Inflammasomes are cytosolic multiprotein complexes involved in the release of inflammatory cytokines after sensing invading pathogens. The activation of pattern recognition receptor (PRRs) such as Nod-like receptors (NLRs), triggers the assembly of inflammasome complexes, which lead to the recruitment of the Inflammasome Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD (ASC). The latter induces the activation of caspase-1 involved in the cleavage of the inactive precursors of IL-1 $\beta$ , and IL-18. The subsequent maturation of these pro-inflammatory cytokines at the sites of infection or injury, will involve various physiological responses, including the recruitment of pro-inflammatory cells. Among the NLR inflammasome complexes, the NLRP3 inflammasome is the most widely characterized, as it is considered to be a crucial signaling pathway that controls the maturation of IL-1 $\beta$  and IL-18. A balanced regulation of the inflammasome activation and the IL-1 family cytokine induction is crucial to maintain immune homeostasis, and allows to appropriately respond to pathogenic stimuli while avoiding uncontrolled

chronic inflammation. A growing body of evidence indicates that compromised autophagy causes aberrant activation of the inflammasomes, leading to the development of inflammatory diseases. Precise mechanisms remain to be elucidated but can involve mitochondrial dysfunctions and release of reactive oxygen species (ROS) which activate the inflammasome [51], as well as decreased targeting of IL-1 $\beta$  for lysosomal degradation by autophagy-deficient cells leading to increased secretion of IL-1  $\beta$  [48,52]. Mice deficient for ATG16L1 display abnormal Paneth cells with a lower amount of granules containing antibacterial defensins, while in turn display an increased IL-1  $\beta$  production [17].

#### *Impact of autophagy in the in vivo protective effects of the strains*

To better address the role of autophagy in the anti-inflammatory capacity of selected strains, we evaluated the impact of the *in vivo* blockage using 3-MA IP daily injection concomitantly with oral administration of two *Lactobacillus* strains in the murine model of TNBS-induced colitis. We selected one strain that we previously showed to be protective through an induction of immune-regulatory response (*L. rhamnosus* A2.21) together with the capacity to restore the epithelial barrier, and the strain *L. acidophilus* CMUL067, that induced its protective effect essentially through an important strengthening of the epithelial barrier and the restoration of TJ proteins [36]. As expected the two strains were able to counteract the TNBS-induced colitis, with a significant reduction of both macroscopic and histological scores of inflammation, of the plasmatic levels of IL-6 and of the colonic expression of genes encoding the pro-inflammatory intestinal markers TNF- $\alpha$ , IL-6 and CXCL2. The protective effects of *L. rhamnosus* A2.21 were significantly inhibited after treatment with 3-MA. As reported using pharmacological stimulation of autophagy [41], we can conclude that *L. rhamnosus* A2.21 strain can reduce gut inflammation by a mechanism involving autophagy, although other mechanisms cannot be ruled out. Moreover, a huge increase of the plasmatic level of IL-1 $\beta$  was in the mice that received the 3-MA, indicating that a loss of control of the inflammasome occurred after blocking the autophagy machinery, as previously reported [16,41]. Interestingly, the blockage of autophagy did not affect the protective capacity of *L. acidophilus* CMUL067. This suggests that autophagy is involved in the immuno-regulatory capacity of lactobacilli but not in the protective abilities linked to strengthening the gut barrier functions. Epithelial autophagy has been implicated in barrier enforcement

during *Salmonella* infection. Indeed autophagy deficiency of intestinal epithelial cells (IECs) led to increased bacterial dissemination and inflammation [53,54]. Using tissue-specific *Atg16L1* deficient mice, Pott *et al.* have demonstrated that autophagy within the intestinal epithelium but not in myeloid cells, is involved in the maintenance of barrier integrity and will limit inflammation in a model of chronic colitis [55]. Epithelial autophagy might also be a response mechanism to mucosal barrier dysfunction in severe acute pancreatitis, by preventing and reducing the oxidative stress. A cell-type-specific function of autophagy has been reported in the context of mucosal homeostasis. Impairment of autophagic function in IECs has been related mainly to Paneth cell dysfunction [56]. In myeloid cells, autophagy is implicated in regulation of proinflammatory cytokine response, particularly secretion of inflammasome-dependent cytokines and ROS levels [16,57]. Recent studies also revealed that autophagy is required for the survival and function of regulatory T-cells in the gut, important to maintain intestinal homeostasis [26]. Multiple cell types, notably epithelial versus hematopoietic cells, interact with commensal bacteria and can mount different and complementary functions in the gut. We previously observed that selected lactobacilli partially activated BMDCs, inducing regulatory DCs able to confer protection towards TNBS-induced colitis after adoptive transfer, in a NOD2-dependent manner [30,58]. Since DCs, the most potent professional antigen-presenting cells, are critical in initiating and maintaining immune homeostasis and tolerance, we investigated how autophagy can impact their function. As previously observed for a *L. salivarius* strain, the adoptive transfer of BMDCs pulsed *in vitro* with *L. rhamnosus* A2.21 was able to confer protection in TNBS-treated mice, while untreated DCs had no effect. When DCs were stimulated by the bacteria in the presence of the autophagy inhibitor 3-MA, they were no longer able to rescue mice from colitis. This indicated that autophagy is involved in the capacity of the selected strain to induce regulatory DCs and that this cellular process is important for DCs to exhibit their function in the gut. Autophagy has been shown to be involved in DC functions at several levels: antigen presentation, cytokine production, DC migration and maturation and T-cell activation. Notably autophagy has been associated with a positive role in the tolerogenic maturation of DCs [25]. Specific disruption of autophagy in CD11c<sup>+</sup> DCs exacerbated DSS-induced murine colitis with increased induction of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . This *Atg16L1* deficiency led to increase in ROS production and was proposed as a novel protective

pathway during gut inflammation [24]. Using DC-IEC co-culture on transwell insert, it has also been demonstrated that the blockage of autophagy through the use of siRNA led to abnormal DC-IEC interactions [59].

### *Conclusion*

Considering the complex cross talk that occurs between the host and the gut microbiota, it is now well recognized that autophagy can act at many different levels. Our study has revealed for the first time that this cellular machinery is involved in the anti-inflammatory capacities of selected potential probiotic strains and particularly in their capacities to induce immune-regulatory responses, notably regulatory DCs. Even if it remains important to dig deeper into the mechanisms involved, we conclude that autophagy is a novel mechanism through which probiotics may counteract IBD.

### **Acknowledgments**

The authors thank the staff of the animal facility of the Institut Pasteur de Lille and the BioImaging Center of Lille, and particularly Elisabeth Werkmeister and the ImaginEx Biomed project.

### **Statement of ethics**

Animal experiments were performed at the animal facility of the Institute Pasteur of Lille (number A59107, Lille, France) and carried out in accordance with the guidelines of laboratory animal care published by the French Ethical Committee and the rules of the European Union Normative (number 86/609/EEC). All the studies were approved by the local investigational ethics review board (Nord-Pas-de-Calais CEEA N°75, Lille, France) and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France (accredited number 201608251651940). The animal experiments also complied with French legislation (Government Act 87-848) and the European Communities Amendment of Cruelty to Animals Act 1976.

### **Disclosure statement:**

The authors declare that they have no conflict of interest

## **Funding sources**

This study was funded by the Association François Aupetit, the Institut Pasteur de Lille, the « Centre National de la Recherche Scientifique » (CNRS) and the University of Lille. M Zaylaa received a PhD grant from the Agence Universitaire de la Francophonie and from the University of Lille.

## **Author contribution**

MZ conceived the design and realization of the experimental work, analysis and interpretation of the data, discussion and writing of the manuscript. CG coordinated the work, participated to the animal experimental procedures, analysis of results, discussion and writing of the manuscript. JA initiated the work and participated to experimental experiments. VP, DB and JD participated to animal and cellular experiments. BP, IAK, FD helped in the discussion and writing of the manuscript. All the authors contributed to the critical review of the manuscript and approved its final version.

## **References**

- 1 Maloy KJ, Powrie F: Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:298–306.
- 2 Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, et al.: Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:685–693.
- 3 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al.: *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16731–16736.
- 4 Darfeuille-Michaud A: Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol IJMM* 2002;292:185–193.
- 5 Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, Kwon AHK, Vasconcelos AC, Cunha LD, et al.: Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* 2016;352:1116–1120.

- 6 Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, et al.: Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 2015;47:979–986.
- 7 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 2001;411:599–603.
- 8 Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al.: A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207–211.
- 9 Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al.: Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn’s disease susceptibility. *Nat Genet* 2007;39:830–832.
- 10 Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J: New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 2011;60:1739–1753.
- 11 Mizushima N, Levine B: Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 2010;12:823–830.
- 12 Yang Z, Klionsky DJ: An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;335:1–32.
- 13 Deretic V: Autophagosome and phagosome. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2008;445:1–10.
- 14 Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al.: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12:1–222.
- 15 Münz C: Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. *Immunol Rev* 2016;272:17–27.
- 16 Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, et al.: Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 2008;456:264–268.
- 17 Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al.: A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008;456:259–263.
- 18 Deretic V: Autophagy in infection. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:252–262.

- 19 Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al.: Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010;11:55–62.
- 20 Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al.: NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010;16:90–97.
- 21 Lapaquette P, Glasser A-L, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A: Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 2010;12:99–113.
- 22 Ortiz-Masiá D, Cosín-Roger J, Calatayud S, Hernández C, Alós R, Hinojosa J, et al.: Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol* 2014;7:929–938.
- 23 Takahama M, Akira S, Saitoh T: Autophagy limits activation of the inflammasomes. *Immunol Rev* 2018;281:62–73.
- 24 Zhang H, Zheng L, Chen J, Fukata M, Ichikawa R, Shih DQ, et al.: The protection role of Atg16l1 in CD11c+dendritic cells in murine colitis. *Immunobiology* 2017;222:831–841.
- 25 Ghislat G, Lawrence T: Autophagy in dendritic cells. *Cell Mol Immunol* 2018; DOI: 10.1038/cmi.2018.2
- 26 Kabat AM, Harrison OJ, Riffelmacher T, Moghaddam AE, Pearson CF, Laing A, et al.: sinflammation. *eLife* 2016;5:e12444.
- 27 Mijan MA, Lim BO: Diets, functional foods, and nutraceuticals as alternative therapies for inflammatory bowel disease: Present status and future trends. *World J Gastroenterol* 2018;24:2673–2685.
- 28 Alard J, Peucelle V, Boutillier D, Breton J, Kuyllé S, Pot B, et al.: New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining in vitro and in vivo approaches. *Benef Microbes* 2018;9:317–331.
- 29 Foligne B, Nutten S, Granette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, et al.: Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 2007;13:236–243.
- 30 Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, Sirard J-C, et al.: A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PloS One* 2007;2:e313.

- 31 Foligne B, Nutten S, Granette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, et al.: Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 2007;13:236–243.
- 32 Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, et al.: An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999;223:77–92.
- 33 Mizushima N, Yoshimori T, Levine B: Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010;140:313–326.
- 34 Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL: Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96:29–36.
- 35 Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK, Takeshita K, Morioka T, Arakaki Y, et al.: Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* 1997;41:487–493.
- 36 Zaylaa M, Al Kassaa I, Alard J, Peucelle V, Boutillier D, Desramaut J, et al.: Probiotics in IBD: Combining in vitro and in vivo models for selecting strains with both anti-inflammatory potential as well as a capacity to restore the gut epithelial barrier. *J Funct Foods* 2018;47:304–315.
- 37 Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P: Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 2000;275:992–998.
- 38 Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y: Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 1998;23:33–42.
- 39 Ortiz-Masiá D, Cosín-Roger J, Calatayud S, Hernández C, Alós R, Hinojosa J, et al.: Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol* 2014;7:929–938.
- 40 Massey DCO, Bredin F, Parkes M: Use of sirolimus (rapamycin) to treat refractory Crohn's disease. *Gut* 2008;57:1294–1296.
- 41 Macias-Ceja DC, Cosín-Roger J, Ortiz-Masiá D, Salvador P, Hernández C, Esplugues JV, et al.: Stimulation of autophagy prevents intestinal mucosal



- inflammation and ameliorates murine colitis. *Br J Pharmacol* 2017;174:2501–2511.
- 42 Lin R, Jiang Y, Zhao XY, Guan Y, Qian W, Fu XC, et al.: Four types of Bifidobacteria trigger autophagy response in intestinal epithelial cells. *J Dig Dis* 2014;15:597–605.
- 43 Dinić M, Lukić J, Djokić J, Milenković M, Strahinić I, Golić N, et al.: Lactobacillus fermentum Postbiotic-induced Autophagy as Potential Approach for Treatment of Acetaminophen Hepatotoxicity. *Front Microbiol* 2017;8:594.
- 44 Wu Y, Wang Y, Zou H, Wang B, Sun Q, Fu A, et al.: Probiotic Bacillus amyloliquefaciens SC06 Induces Autophagy to Protect against Pathogens in Macrophages. *Front Microbiol* 2017;8:469.
- 45 Zhang W, Zhu Y-H, Yang G-Y, Liu X, Xia B, Hu X, et al.: Lactobacillus rhamnosus GG Affects Microbiota and Suppresses Autophagy in the Intestines of Pigs Challenged with Salmonella Infantis. *Front Microbiol* 2017;8:2705.
- 46 Han C, Ding Z, Shi H, Qian W, Hou X, Lin R: The Role of Probiotics in Lipopolysaccharide-Induced Autophagy in Intestinal Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2016;38:2464–2478.
- 47 Lee J, Kim HR, Quinley C, Kim J, Gonzalez-Navajas J, Xavier R, et al.: Autophagy suppresses interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways. *J Biol Chem* 2012;287:4033–4040.
- 48 Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O’Shea A, Sharp FA, et al.: Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol Chem* 2011;286:9587–9597.
- 49 Deretic V: Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev* 2011;240:92–104.
- 50 Crişan TO, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Farcaş MF, Stoffels M, Kullberg B-J, et al.: Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells. *PloS One* 2011;6:e18666.
- 51 Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al.: Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011;12:222–230.

- 52 Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V: Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ . *EMBO J* 2011;30:4701–4711.
- 53 Benjamin JL, Sumpter R, Levine B, Hooper LV: Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria. *Cell Host Microbe* 2013;13:723–734.
- 54 Conway KL, Kuballa P, Song J-H, Patel KK, Castoreno AB, Yilmaz OH, et al.: Atg16l1 is required for autophagy in intestinal epithelial cells and protection of mice from Salmonella infection. *Gastroenterology* 2013;145:1347–1357.
- 55 Pott J, Kabat AM, Maloy KJ: Intestinal Epithelial Cell Autophagy Is Required to Protect against TNF-Induced Apoptosis during Chronic Colitis in Mice. *Cell Host Microbe* 2018;23:191-202.e4.
- 56 Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, Ko H-J, Böck J, Martinez-Naves E, et al.: Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* 2013;503:272–276.
- 57 Lassen KG, Kuballa P, Conway KL, Patel KK, Becker CE, Peloquin JM, et al.: Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:7741–7746.
- 58 Macho Fernandez E, Fernandez EM, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, et al.: Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 2011;60:1050–1059.
- 59 Strisciuglio C, Duijvestein M, Verhaar AP, Vos ACW, van den Brink GR, Hommes DW, et al.: Impaired autophagy leads to abnormal dendritic cell-epithelial cell interactions. *J Crohns Colitis* 2013;7:534–541.
- 60 Tannock GW: Biotin-labeled plasmid DNA probes for detection of epithelium-associated strains of lactobacilli. *Appl Env Microbiol* 1989 [cited 2018 Sep 5];55:461–464.

## Figure legends

**Fig.1. Bacterial strains induced autophagy in murine bone marrow-derived dendritic cells.** BMDCs were pre-treated or not with bafilomycin A1 (100 nM) for 1 h and stimulated with bacteria at a bacteria/cells ratio of 10:1 or with Rapamycin (10 µg / ml) for 4 h. The autophagy was followed by (A) LC3-immuno-labelling followed by confocal laser scanning microscopy and measurement of the number of autophagosomes in the form of LC3-labelled puncta. The data represent the mean ± SEM. \* refers to the comparison of bacteria-treated group versus untreated control group; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. (B) The ratio of LC3-II to LC3-I, after western blotting analysis. The data represent the mean ± SEM. \* and # refer to the comparison of bacteria-treated groups versus untreated control group (N/S) in the absence or presence of bafilomycin, respectively. ; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\* or ### p < 0.001.

**Fig. 2. Blockade of autophagy enhanced IL-1β production while decreased IL-10 secretion in human PBMCs and murine BMDCs stimulated by the bacteria.** (A) PBMCs (2 x 10<sup>6</sup> cells/ml, n= 5 different donors) were pre-treated or not for 1 h at 37 °C with 3-MA (5 mM) or bafilomycin (100 nM) and subsequently stimulated by the different strains for 20 h. IL-10 and IL-1β release was measured in the supernatants. Data represent means ± SEM of 5 independent donors. \* refers to the comparison of bacteria-stimulated PBMCs in the presence or absence of the inhibitors; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (B) BMDCs (0.75 x 10<sup>6</sup> cells/ well) were pre-treated or not for 1 h at 37 °C with 3-MA (5 mM) and subsequently stimulated by the different strains for 20 h. IL-1β release was measured in the supernatants. Data represent means ± SEM of 3 different experiments. \*p < 0.05 refers to the comparison of bacteria-stimulated BMDCs in the presence or absence of 3-MA.

**Fig. 3. In vivo inhibition of autophagy limited the capacity of *L. rhamnosus* A2.21 to rescue mice from acute TNBS-induced colitis.** (A) Experimental protocol used for the mouse model of acute colitis induced by intrarectal administration of TNBS (105 mg/Kg), intragastric administration of bacteria and IP injection of 3-MA. (B) Body weight loss (as a percentage of the initial weight) (C) Macroscopic evaluation of colonic inflammation (Wallace score) (D) Representative histological sections

(stained by May Grünwald Giemsa, 100X magnification) of mice treated (TNBS) or not (Healthy mice) with TNBS, and orally administrated (or not) with the selected strains and treated (or not) by IP injection of 3-MA (E) Histologic evaluation of colonic inflammation (Ameho score) (F) Plasmatic IL-6 and IL-1 $\beta$  concentrations measured by ELISA, two days after colitis induction (G) Gene expression of *cxcl2*, *il6*, *tnfa*, *zo1*, and *occludin* from colonic samples. Values are expressed as the relative mRNA levels of samples compared with colons from healthy mice. The data represent the mean values of each group (n=10)  $\pm$  SEM. \* and # refer to the comparison of bacteria-treated groups versus TNBS control group or TNBS group versus healthy mice, respectively; \*p < 0.05, \*\*or<sup>###</sup> p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

**Fig. 4. The protective capacity of the adoptive transfer of *L. rhamnosus*-treated BMDC is abolished after pharmacological inhibition of autophagy** (A) Experimental protocol used for the murine model of acute colitis induced by intrarectal administration of TNBS (105 mg/Kg) and adoptive transfer of BMDCs. (B) Body weight loss (as a percentage of the initial weight) (C) Macroscopic evaluation of colonic inflammation (Wallace score). (D) Histologic evaluation of colonic inflammation (Ameho score) (E) Representative histological sections (stained by May Grünwald Giemsa, 100X magnification) of mice treated (TNBS) or not (Healthy mice) with TNBS, and IP treated with *L. rhamnosus*-pulsed (or not) BMDCs, treated (or not) with 3-MA (F) Plasmatic IL-6 concentrations, measured two days after colitis induction by ELISA. (G) Gene expression of *cxcl2*, *il6*, *tnfa*, and *il1b* from colonic samples. Values are expressed as the relative mRNA levels of samples compared with colons from healthy mice. The data represent the mean values of each group (n=10)  $\pm$  SEM. \* and # refer to the comparison of BMDCs-treated groups versus TNBS control group or TNBS group versus healthy mice, respectively; # or \*p < 0.05, \*\*or<sup>###</sup> p < 0.01 \*\*\* p < 0.001

**Table I: List of bacterial strains used in the study**

<b>Species</b>	<b>Strains</b>	<b>Source of isolation</b>
<i>B. bifidum</i>	IPL A7.31	Infant Stool
<i>B. longum</i>	CMUL CLX 001	Human vagina
<i>L. reuteri</i>	100-23	Rodent intestine [60]
<i>L. gasseri</i>	IPL A6.33	Human vagina
<i>L. rhamnosus</i>	IPL A2.21	Human vagina
<i>L. gasseri</i>	CMUL057	Human vagina
<i>L. acidophilus</i>	CMUL067	Human vagina

Figure 1

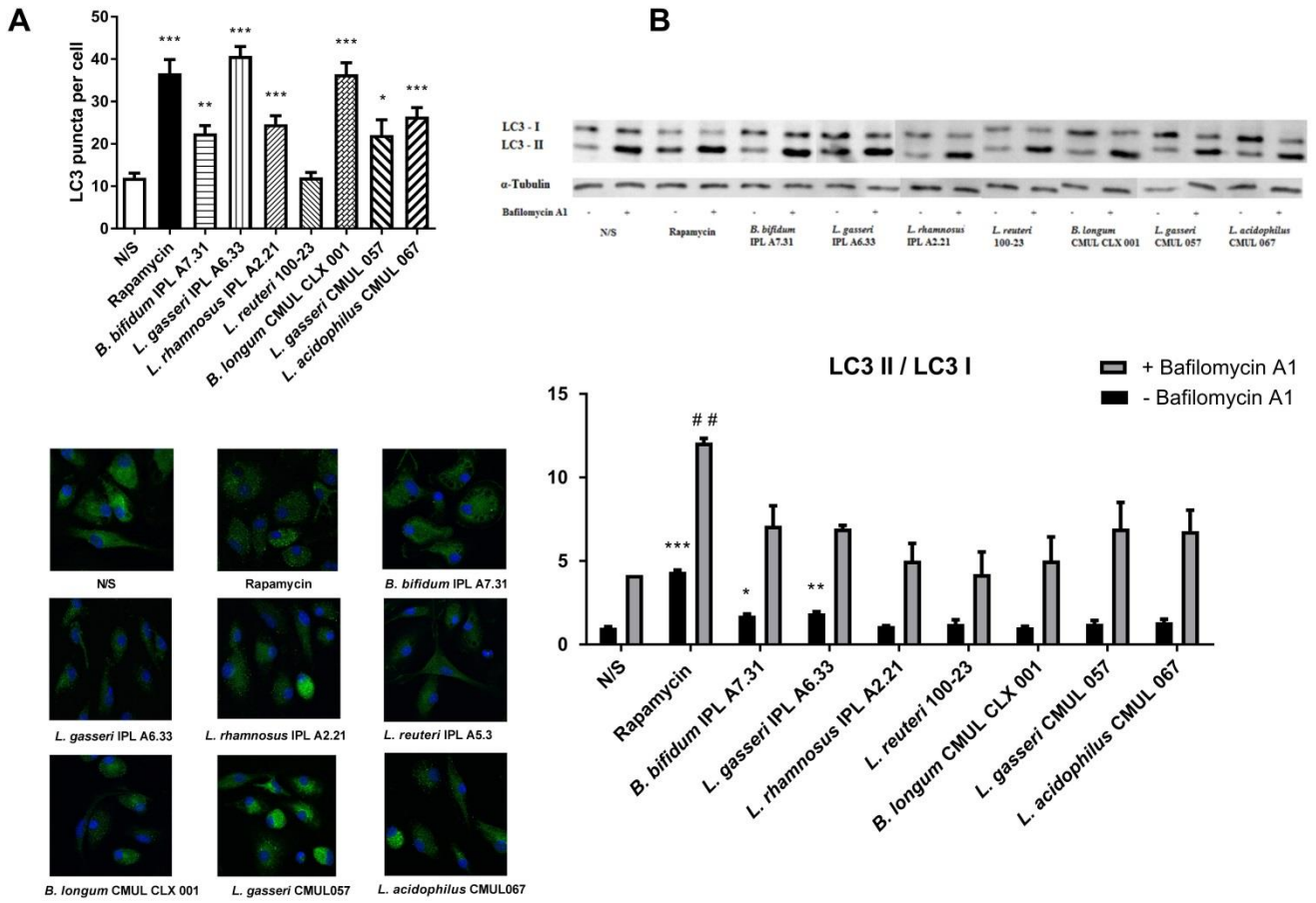




Figure 3

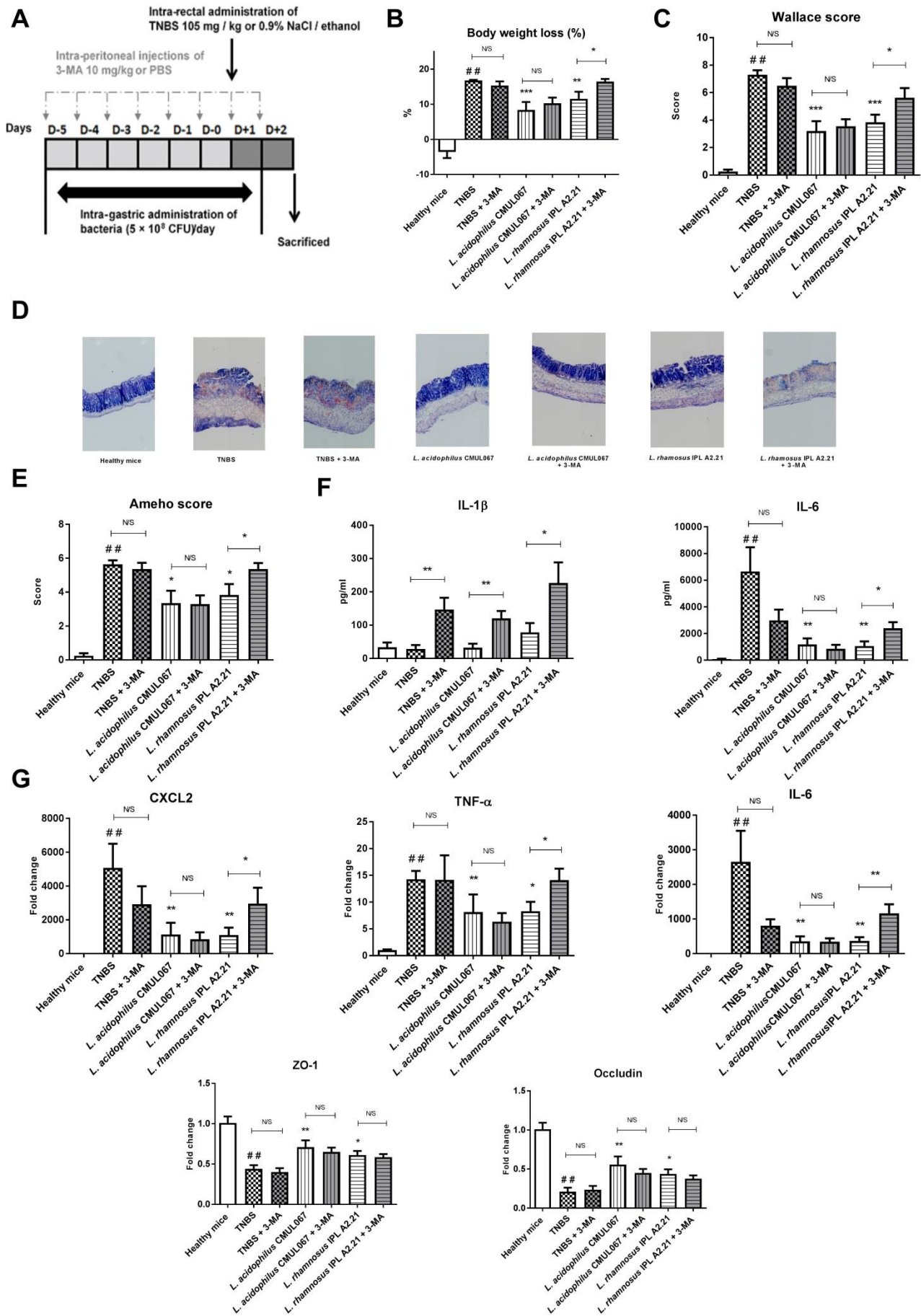




Figure 4

