

Université Lille1 – Sciences et Technologies

Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches

Benoît FOLIGNÉ

CR Institut Pasteur de Lille (IPL)

***Homéostasie Intestinale :
Éléments perturbateurs et modulateurs ...***

Soutenance : *le 13 Novembre 2009, à Lille, Institut de Biologie de Lille.*

Jury d'examen :

Président : Pr Bruno POT, DR IPL
Université Libre de Bruxelles, (VUB), Belgique, équivalent HDR

Directeur de Recherche : Pr Didier VIEAU, *Université de Lille 1*

Rapporteurs : Dr Annick MERCENIER, *Centre de recherche Nestlé, Suisse*
Dr Isabelle WOLOWCZUK, *DR CNRS, Université de Lille, HDR*
Dr Gwenaël JAN, *CR INRA, Université de Rennes 1, HDR*

Examineurs : Pr Christophe BRETON, *Université de Lille 1, HDR*
Dr François MEURENS, *CR INRA, Université de Tours, HDR*

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble du jury de me faire l'honneur de juger cette Habilitation à Diriger des Recherches :

*Plus particulièrement, je remercie **Mr le Professeur Bruno POT** d'en présider le jury ; au-delà de sa qualité de Directeur du laboratoire qui m'a accueilli il y a maintenant près de 7 ans, je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour une aide précieuse et constante associée à l'autonomie qu'il a su m'accorder tout au long de ces années.*

*Qu'il me soit permis d'exprimer mes sincères remerciements à **Mr le Professeur Didier VIEAU**, qui, bien que me connaissant finalement peu, s'est porté garant de mon parcours scientifique auprès de l'Université de Lille 1 en assurant le rôle de Directeur de Recherche. J'aurai plaisir à travailler avec lui à l'avenir et l'assure de toute ma confiance.*

*J'adresse à **M^{me} le Docteur Annick MERCENIER** ma profonde gratitude pour m'avoir accordé son temps et son soutien. J'aurai difficilement imaginé de présenter cette HDR sans sa présence qui m'honore. Son parcours académique notoire et son implication actuelle dans le monde industriel s'inscrivent pleinement dans ce cadre. Que l'occasion me soit donnée ici de mentionner ses qualités humaines.*

*Je remercie vivement **Mr le Docteur Gwenaël JAN** d'avoir accepté de juger ce travail. Au-delà de ses compétences reconnues, sa qualité de représentant de l'INRA mais surtout de l'Université de Rennes résonne à mes propres origines universitaires et géographiques. Je sais par ailleurs ses remarques et critiques très constructives.*

*Pour faire écho à ma région désormais d'adoption, le Docteur **Isabelle WOLOWCZUK** en sa qualité de représentant du CNRS mais surtout de son implication à l'Université de Lille et au sein de l'école doctorale, a bien voulu porter un regard sur mon parcours professionnel. Ses connaissances multidisciplinaires en Immunologie, Microbiologie et Neurologie, la pertinence de ses questions, de son analyse et de sa personnalité sont riches d'enseignement.*

*Merci également à **Mr le Professeur Christophe BRETON** de sa contribution et de me faire l'amitié de sa présence.*

*Je suis aussi très sensible à la présence « vétérinaire » du **Dr François MEURENS**.*

*A ma Famille,
A ceux qui en font partie par adoption,
...*

A Globule ...



Ce que l'on te reproche, cultive-le ! C'est Toi ...

J. Cocteau.

Je remercie l'institut Pasteur de Lille de m'avoir donné les moyens de développer et poursuivre mes projets, son directeur général le Pr P. AMOUYEL et son directeur des affaires scientifiques, le Dr C. LOCHT.

Je remercie sincèrement le Pr Michel SIMONET de son soutien et n'oublie pas lui devoir beaucoup ... Je garde des souvenirs de « rédactions » acharnées, aux côtés de Catherine, dans l'humour et la bonne humeur.

Je souhaite témoigner ma reconnaissance à l'ensemble du personnel passé et présent du laboratoire des Bactéries Lactiques et immunité des muqueuses ; qui ont tous contribué de près ou de loin au développement de mon activité de recherche ; en particulier les Docteurs Catherine Daniel, Corinne Grangette, Mickaël Hisbergues et Georges Abboud ; Elise Macho-Fernandez, Véronique Peucelle-Dennin, Véronique Valenti, Denise Boutillier, Sabine Poirret, Marie-Christine Renaud et plus récemment Jérôme Breton. Je tiens aussi à citer Stéphane Delhaye et Georgia Zoumpoulou.

Une attention particulière à Joëlle Dewulf qui, au-delà d'être un Ingénieur d'étude d'une grande qualité et d'une aide précieuse, se double d'une personnalité rare. Je souhaite que notre duo se poursuive dans la prochaine « mélodie » ... Elle a toute mon amitié.

J'associe également les Dr Sophie Nutten et Guérolée Prioult du CRN et les remercie de leur contribution.

D'une manière plus générale, mes collègues et amis de l'IBL, notamment ceux du 4^{ème} étage et du Dpt de Microbiologie ; les voisins déjà « Seniors » Christophe Carnoy, Mickaël Marceau, Elizabeth Pradel, Florent Sebbane et Jean-Claude Sirard, mes plus « jeunes » amis ; Claire, Clément, Julien H, Xavier C (Globule-sitter), Xavier R et Nicolas B.

Je souhaite enfin remercier le personnel de l'animalerie, infrastructure essentielle à mon activité ; J-P Decavel et surtout Thierry Chassat pour ses conseils et son dévouement. Merci aussi à Han Vorng de sa disponibilité.

Résumé

Le principal thème de ma recherche s'intéresse au rôle régulateur que peut jouer la flore intestinale et sa manipulation dans la physiologie normale et pathologique de la sphère digestive et, par voie de conséquences, sur l'homéostasie générale de l'organisme. En utilisant d'une part des micro-organismes non-pathogènes variés (grande diversité de bactéries lactiques, mais aussi des levures), et d'autre part des modèles animaux associés à des contextes inflammatoires et infectieux particuliers, il s'agit de caractériser non seulement les effets anti-inflammatoires et/ou anti-infectieux propres ou communs à diverses souches, mais aussi les conditions d'obtention de ces effets tant du point de vue microbiologique que du point de vue de l'hôte, selon les spécificités du modèle. Parce que les propriétés "probiotiques" sont multiples et font appel à des mécanismes variés en fonction des modèles, cette approche intégrée a un double objectif d'identification de souches à potentialité thérapeutique et de compréhension de tout ou partie(s) des mécanisme(s) mis en jeu. A la lumière des propriétés spécifiques de souches caractérisées *in vitro* (immunologiques, métaboliques, structurales...), il est possible de comparer leurs performances propres dans des modèles animaux. Les points forts associés à cette recherche reposent avant tout sur : (i) une bonne connaissance de la physiopathologie intestinale, (ii) une maîtrise de l'expérimentation animale chez le rongeur et (iii) des liens privilégiés établis avec le secteur industriel, permettant d'associer une recherche concrète et appliquée à des préoccupations fondamentales plus mécanistiques. C'est ainsi que nous avons également établi une corrélation entre les capacités immuno-modulatrices des bactéries *in vitro* et leur effet préventif ou thérapeutique anti-inflammatoire dans des modèles de colite expérimentale. Ce travail dynamique se poursuit soit en partenariat avec l'industrie agroalimentaire (identification de nouvelles souches, de conditions de préparations technologiquement plus résistantes, ...); ou encore en caractérisant et comparant des souches de nouveaux microorganismes reflétant la biodiversité, en collaboration avec des partenaires industriels et académiques (effets probiotiques de levures alimentaires, de bactéries propioniques, de souches de bactéries lactiques d'origine œnologique).

Cette expertise a en outre contribué à identifier des voies mécanistiques de l'action potentielle de certains probiotiques, notamment l'orientation de cellules dendritiques (DCs) à profil régulateur (maturation partielle) en montrant le rôle protecteur *in vivo* de ces DCs par transfert adoptif. Elle a également mis en évidence les potentialités thérapeutiques de molécules anti-inflammatoires (IL-10, protéine LcrV dérivée du pathogène *Yersinia pseudotuberculosis*) délivrées *in situ* par des bactéries lactiques recombinantes dans 2 modèles distincts de colites expérimentales (TNBS et DSS).

Plus récemment, des modèles infectieux murins permettant l'évaluation préventive ou thérapeutique de souches probiotiques vis-à-vis d'une infection à *Salmonella typhimurium*, ou encore de l'agent *Citrobacter rodentium* ont été développés pour compléter les données sur l'impact des probiotiques sur le système immunitaire, inné et adaptatif, en intégrant la composante inflammatoire des infections associées à ces agents pathogènes.

C'est donc l'approche intégrée de l'utilisation de plusieurs modèles pathologiques qui permet d'identifier les effets respectifs de candidats probiotiques, en associant ou privilégiant un mode d'action particulier sur le système immunitaire (inné, adaptatif, orientation Th1, Th2, Th17...), un rôle trophique ou métabolique. Le recours à des animaux transgéniques (IL-10-/-, déficients pour TLR, nod1 et 2 et les cascades de signaux associés, d'autres ...) a déjà permis et permettra de préciser ces modes d'action et la fonctionnalité des bactéries lactiques ou dérivés.

Enfin, à l'avenir le rôle majeur du stress oxydant sera pris en compte dans ces contextes, ouvrant des perspectives d'application des probiotiques dans d'autres pathologies immunes où le stress oxydatif est prépondérant (désordres métaboliques, stress nutritionnel, intoxications aux métaux lourds); ce dernier point faisant l'objet d'un programme d'étude particulier pour les 3 prochaines années (ANR 2010-2013).

Sommaire

Curriculum Vitae	p 14
Formation	p 16
Activité de Recherche	p 17
Encadrement	p 17
Publications	p 18
Communications	p 20
Collaborations scientifiques	p 23
Contrats de Recherches	p 24
Activités d'enseignement	p 26
Responsabilités	p 27
Travaux de Recherche	p 30
Parcours scientifique / Présentation	
Introduction générale	
Homéostasie & Allostasie de l'Ecosystème intestinal :	
une dynamique adaptative, des agressions variées, des interventions multiples	p 34
Travaux de Thèse :	
<u>Désadaptation au Stress, Vieillesse, et Fonctionnalité intestinale</u>	p 56
<i>Article 1, 2, 3. Dig Dis & Sci. 2001, 2003, 2004</i>	
Travaux de Post-Doctorat : Biothérapeutiques et Inflammation	
<u>Bactéries Lactiques et Immunomodulation</u>	
I- Contribution au programme Européen "DeproHealth"	p 60
<i>Article 4, Dig Dis & Sci. 2006</i>	
<i>Article 5, World J Gastroenterol.</i>	
II- Projet "LcrV"	p 68
<i>Article 6, Gastroenterology 2007</i>	
III- <u>Fonctionnalité probiotique : rôle potentiel des cellules dendritiques</u>	p 74
<i>Article 7, PlosOne 2007</i>	
Travaux depuis l'obtention du poste de CR IPL :	
Biothérapeutiques, Inflammation ... et Infections	
I- <u>Biothérapeutiques, Inflammation ... et Infections</u> ,.....	p 78
II- Projet " <u>Biodiversité Probiotique</u> "	p 82
Projets de Recherche 2010-2013	p 88
I- Projet "Mélodie-Rêve"	
<u>Métaux Lourds, Désordres Immunitaires, Ecotoxicologie Intestinale</u>	
<u>& Remédiation in vivo</u>	p 92
<i>Programmation ANR 2009 "Contaminants-Ecosystèmes-Santé"</i>	
II- <u>Stress périnatal, Développement & Fonctionnalité intestinale</u>	p 94
Conclusion et Remarques	p 98
Bibliographie	p 104
Annexes	p 110
Résumé	verso

Curriculum Vitae

Curriculum Vitae



Benoît FOLIGNÉ, Ph.D.

Chargé de Recherche - Institut Pasteur de Lille (IPL)

Bactéries Lactiques & Immunité des Muqueuses

Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille,

IFR 142, Médecine Cellulaire et Moléculaire.

1, rue du Professeur Calmette

BP 245 - 59019 Lille Cedex - France.

☎ : +33 320 87 11 91 📠 : +33 320 87 11 92

✉ : benoit.foligne@ibl.fr

Etat Civil

Né le 13 Novembre 1970, à Saint-Malo (35).

Nationalité Française, Célibataire.

Formation

Licence de Biochimie, option Physiologie animale (mention Bien) *Juin 1993*
Université de Rennes 1.

Maîtrise de Biochimie, option Microbiologie (mention Bien) *Juin 1994*
Université de Rennes 1.

Diplôme d'Etudes Approfondies (mention Bien) *Sept. 1996*
Biologie du Vieillessement
Université Paris 7 (D. Diderot) / Université Toulouse III (P. Sabatier).

Doctorat de Biologie du Vieillessement (mention Très Honorable) *Juillet 2002*
ED 157 ; GCI2D : Génétique - Cellule - Immunologie - Infectiologie - Développement
Université Paris 7 (D. Diderot).

Habilitation à l'Expérimentation Animale - Niveau I *Sept. 2005*
(Accréditation 59-350159, valide jusqu'au 31 /03/2011).

Activité de Recherche

Diplôme d'Etudes Approfondies (*Sept. 1995 à Juillet 1996*)

Thématique : Photovieillissement de l'épiderme : détection *in situ* des protéines inflammatoires et des ARNm induits par irradiations UV A et B.

Responsable scientifique : *Dr Marie CHARVERON*

Laboratoire : Institut de Recherche Pierre Fabre -
Pharmacologie Cellulaire Cutanée, Toulouse (31).

Doctorat (*Sept. 1998 à Juillet 2002*)

Thématique : Vieillesse de l'appareil digestif et Nutrition :

"Impact d'un régime supplémenté en Yaourt sur la trophicité intestinale du rat âgé sur un modèle *in vivo* de détresse digestive

Responsable scientifique : *Pr Daniel BALAS*

Laboratoire : Groupe de Recherche sur la Trophicité et le Vieillesse (GRTV)
Faculté de Médecine de Nice (06).

Post-Doctorat 1 (*Janvier 2003 à Février 2006*)

Thématique : Effets immunomodulateurs des bactéries lactiques,
Réalisation de contrats de recherches industriels

Responsables scientifiques : *Dr B. POT, Dr A. MERCENIER*

Laboratoire : Bactéries Lactiques & Immunité des Muqueuses,
IPL, IBL, Lille (59).

Post-Doctorat 2 (*Mai 2006 à Avril 2007*)

Thématique : Effets immunomodulateurs des bactéries lactiques

Applications des probiotiques aux modélisations d'inflammation intestinale. Gestion et Réalisation de contrats de recherches industriels

Responsable scientifique : *Dr B. POT,*

Laboratoire : Bactéries Lactiques & Immunité des Muqueuses, IPL, IBL.

Laboratoire associé : Unité INSERM U801, IBL, Dir. Pr M. SIMONET.

Partenaire industriel : Centre de Recherche Nestlé, Resp. Dr A. MERCENIER.

Poste de Chargé de Recherche IPL (*depuis Mai 2007*)

Directeur d'équipe: *Dr B. POT.*

Laboratoire : Bactéries Lactiques & Immunité des Muqueuses, IPL, IBL.

Thématique : Applications des probiotiques aux modèles *in vivo* et *in vitro* d'inflammations et d'infections intestinales.

Gestion et Réalisation de contrats de recherches industriels.

Développement de nouveaux modèles.

Collaborations scientifiques

Nationales :

Dr Gwénaél JAN, Dr Sylvie LORTAL,

UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'œuf (STLO), 35042 Rennes Cedex
INRA-Agrocampus Ouest Rennes, France.

*Propriétés immunomodulatrices des bactéries du genre *Propionibacterium*.*

Pr Aline LONVAUD-FUNEL,

UMR 1219 Œnologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, INRA, ISVV, 33405
Talence, France.

*Propriétés immunomodulatrices des bactéries lactiques Œnologiques (genres
Oenococcus et *Pediococcus*)*

Pr Jean-Pierre HUGOT, Dr Frédéric BARREAU,

INSERM, U843, Université Paris 7, Hôpital Robert Debré, 75020 Paris, France.

Inflammation et Perméabilité intestinale,

Pr Didier VIEAU,

Dénutritions maternelles périnatales, Université Sciences & Technologies de Lille 1,
France.

*Relation mère/lactation/absorption intestinale chez le rat nouveau-né issu de mère
dénutrie.*

Dr Jean-Claude SIRARD, Dr Christophe CARNOY, Dr Florent SEBBANE,

INSERM, U801, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille 2, Lille, France

Analyses histo-morphologiques du Tissu intestinal, hépatique, cutané et ganglionnaire.

Internationales :

Dr Annick MERCENIER, Dr Guénolette PRIOULT, Dr Fabrizio ARIGONI,

Nestlé Research Center, Lausanne, Switzerland.

Immunomodulation by lactic acid bacteria

Dr Lothar STEIDLER, Dr P. ROTTIERS,

Department for Molecular Biomedical Research, Flanders Interuniversity Institute for
Biotechnology and Ghent University, Belgium.

Immunomodulation by genetically engineered lactic acid bacteria

...

Contrats de Recherche

Mise en œuvre et/ou supervision de nombreux **Contrats Industriels** (partenaires français, européens et internationaux ; PME et Grands groupes ...) sous forme de contrats de recherche fondamentale, recherche appliquée ou de Prestations de Services, réalisés par le Laboratoire Bactéries Lactiques & Immunité des Muqueuses, et gérés par l'Institut Pasteur de Lille.

Tout ou parties de ces contrats et des résultats générés peuvent apparaître confidentiels et en limiter la valorisation directe. Toutefois, un certain nombre de ces études a permis/va permettre l'élaboration prochaine de publications conjointes (2 manuscrits soumis, 2 en préparation, 3 en projet) et la participation au dépôt de brevets. Par ailleurs, ces travaux contribuent également à documenter et argumenter les dossiers de sécurité alimentaire et pharmaceutique de nos partenaires auprès des agences nationales et autorités légales en la matière. Comme il sera précisé plus loin, cette recherche appliquée « alimente » en amont une recherche plus mécanistique en offrant (et finançant) une sélection de souches variées et en contribuant à l'implémentation de nouveaux modèles.

Ces études concernent principalement l'évaluation *in vitro* ainsi qu'*in vivo*, des propriétés pro- ou anti-inflammatoires, pro- ou anti-infectieuses, de molécules, conditions nutritionnelles, supplémentation de microorganismes ou de leurs dérivés à visée probiotique. Le recours à des microorganismes modifiés (mutants ou organismes génétiquement modifiés) peut s'avérer judicieux dans la recherche des mécanismes impliqués.

Cette activité repose sur la maîtrise de modèles cellulaires variés et l'expertise de modèles animaux d'infections (pathogènes de classe 1 et 2) et d'inflammation ; leur amélioration et le développement de nouveaux modèles, dans le respect des règles éthiques, locales et nationales.

La mise en œuvre de ces contrats implique une logistique soutenue et une relative flexibilité pour un respect des délais reconnu, à la fois dans la réalisation et la transmission des rapports d'études.

Les montants respectifs des divers contrats individuels sont confidentiels, toutefois, l'ensemble de ces « collaboration industrielles » représente généralement 200 à 300 K€ annuels et justifient une part importante de mon activité de CR IPL.

Parmi nos partenaires principaux et réguliers, on peut citer :

Centre de Recherche NESTLÉ, Lausanne, Suisse.

DANISCO, Copenhague DANEMARK

BIONEER A/S, Hørsholm, Danemark.

KEMIN Pharma Europe Bvba, Herentals, Belgique.

Centre de Recherche DANONE-VITAPOLE, Paris (75), France.

S^{té} LESAFFRE International, Marcq-en-Baœuil (59), France.

PiLeJe, Paris (75), France.

LARENA, Paris (75), France.

GENIBIO Industries, Lorp-Sentaraille (09), France,

Encadrement

Responsable de Stages d'études

En co-tutelle avec le Pr D. Vieau,
Jean-Sébastien Watz
Master Recherche M2
Biologie et Santé (USTL)

(Sept. 2009-Juin. 2010)

Jérôme Breton

Master Professionnel M2
Biologie et Biotechnologie - mention Génie cellulaire et Moléculaire (USTL)

2009 (Mars-Août)

Encadrement professionnels

Supervision de personnel lors de la réalisation de contrats de Recherche industriels
Ingénieurs d'études : M^{me} J. Dewulf, M^r S. Delhaye, M^{elle} M. Billet,

Encadrements indirects, Formation,

Depuis 2000 à aujourd'hui

Encadrement partiel, initiation à la recherche et transfert méthodologique pour de nombreux étudiants français et étranger accueillis en stages dans mes divers laboratoires d'accueils, voisins et collaboratifs.

Niveaux : CM2 (Kid Campus, IPL), lycéens, Licence, Maîtrise, DEA, Thèse (T) et Post-doctorats.

Principalement,

P. Maragdoukakis (T),
G. Zoumpoulou (T),
F. Delahaye (T),
E. Macho-Fernandez (T),
S. Aissaoui (DEA),
S. Bilski,
S. Delhaye (M2), S. Segui (M1),

Activités d'enseignement

Qualifications aux fonctions d'enseignant-Chercheur, obtenues en 2005 dans les sections : Biologie cellulaire, Physiologie, Biochimie et Biologie moléculaire.

Activités d'enseignements depuis 2004 ...

(Cours, examens, corrections de copies et participation aux Jurys ...).

Formation au diplôme d'État de Psychomotricien qui dure **trois années**, effectuée dans un centre de formation agréé par le Ministère de la Santé et le Ministère de l'Éducation Nationale. Les enseignements sont dispensés à

L'institut de Formation des Psychomotriciens R. LECLERCQ

Région Nord / Pas de Calais,

En convention avec l'Université du Droit et de la Santé- Lille 2

« Caducée », - Parc Eurasanté – Bât. E

57, rue Salvador Allende 59120 LOOS.

www.institutpsychomot-nord.com

Année Universitaire 2004-2005 :

Classe préparatoire au concours d'entrée : Cours de «Génétique» ; 20 heures annuelles (Génétique fondamentale, cellulaire et moléculaire);

Année Universitaire 2005-2006 :

Classe préparatoire au concours d'entrée : Cours de «Génétique» ; 20 heures annuelles (Génétique fondamentale, cellulaire et moléculaire);

Année Universitaire 2006-2007 :

Classe préparatoire au concours d'entrée : Cours de «Génétique» ; 20 heures annuelles (Génétique fondamentale, cellulaire et moléculaire);

et

Première année de la Formation : Cours d'Anatomie générale ; 50 heures annuelles (Ostéologie- Arthrologie - Myologie / Structures fonctions & Nomenclatures) ;

Année Universitaire 2007-2008 :

Classe préparatoire au concours d'entrée : Cours de «Génétique» ; 20 heures annuelles (Génétique fondamentale, cellulaire et moléculaire);

et

Première année de la Formation : Cours d'Anatomie générale ; 50 heures annuelles (Ostéologie- Arthrologie - Myologie / Structures fonctions & Nomenclatures) ;

Année Universitaire 2008-2009 :

Classe préparatoire au concours d'entrée : Cours de «Génétique» ; 20 heures annuelles (Génétique fondamentale, cellulaire et moléculaire);

et

Première année de la Formation : Cours d'Anatomie générale ; 50 heures annuelles (Ostéologie- Arthrologie - Myologie / Structures fonctions & Nomenclatures) ;

Ces activités d'un **total de 70h annuelles** sont maintenues et reconduites chaque année.

Responsabilités / Animation

Membre du Comité Régional d'Ethique en Expérimentation Animale

Correspondant Hygiène et Sécurité auprès le CNRS (Bât. IBL) pour le Laboratoire Bactéries Lactiques & Immunité des Muqueuses, IPL.

Rédaction et Soumissions de Protocoles
auprès le Comité Régional d'Ethique en Expérimentation Animale
(CEEA, Nord - Pas de Calais).

Membre du Bureau éditorial de revue scientifiques

Journal of Pain Research www.dovepress.com/journal-of-pain-research-journal

Dairy Science and Technology (DST) www.dairy-journal.org

« Reviewer » régulier pour journaux scientifiques à comités de lectures

10 à 12 / an

International Journal of Food Microbiology.

Infection and Immunity.

International Archives of Allergy & Immunology.

Digestive Diseases and Science.

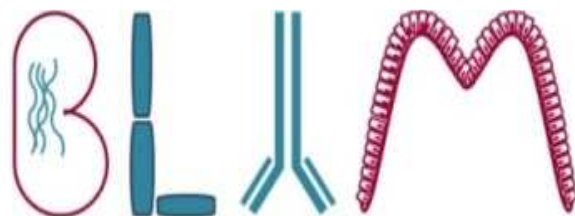
International Immunology and Pharmacology

Medical Science Monitor.

International Journal of Pre- and Probiotics.

Création du Logo « BLIM » du laboratoire ...

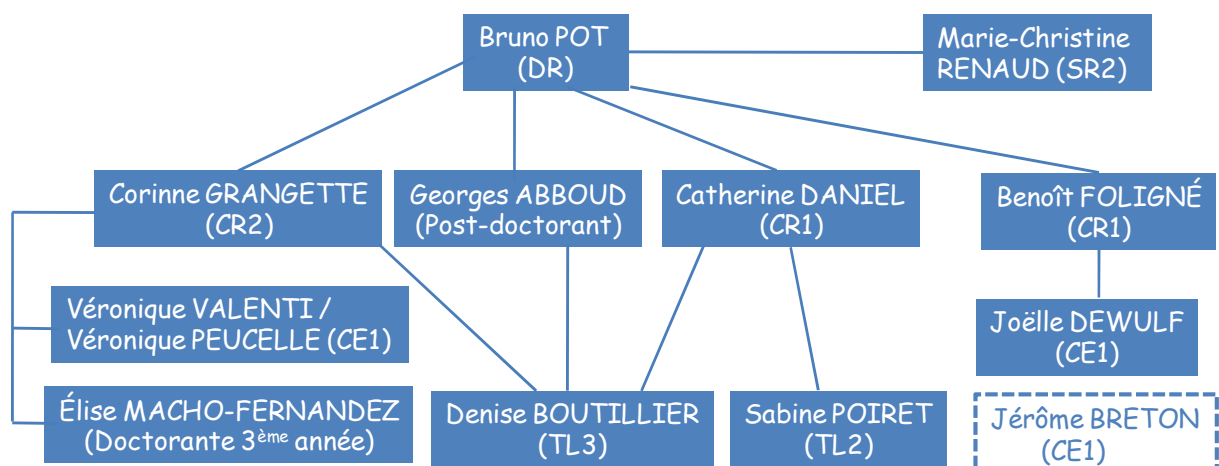
(2006)



Bactéries Lactiques &
Immunité des Muqueuses

Organigramme du laboratoire

Le laboratoire **Bactéries Lactiques & Immunité des Muqueuses**, dirigé par **Bruno POT**, est actuellement composé de 12 personnes, toutes salariées de l'Institut Pasteur de Lille :



Organigramme du laboratoire : **Bactéries Lactiques & Immunité des Muqueuses**.

Remarque : les classes de Chargé de Recherche IPL sont inversement correspondantes aux classes INSERM, CNRS et INRA où CR1 équivaut à CR2 et CR2 équivaut à CR1 ...

Publications

B. Pot and B. Foligné. Can probiotics influence gut immunity? The proof is in the eating...". Invited review: 16th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health: Korea, august 2009, article in Korean.

Foligné B., Pot B. 2009. Comment on "Some immunomodulatory effects of probiotic bacteria might be due to porcine neutrophil elastase inhibitor, a serpin present in MRS broth". *Immunol Lett.*;122:227-8.

Zoumpopoulou G., B. Foligné, K. Christodoulou, C. Grangette, B. Pot and E. Tsakalidou. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against TNBS-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *Int. J. Food Microbiol.*, 121:18-26.

Foligné B., R. Dessein, M. Marceau, S. Poirer, J. Dewulf, B. Pot, M. Simonet and C. Daniel. 2007a. Therapeutic potential of *Yersinia* anti-inflammatory components. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 603:361-366.

Foligné B., R. Dessein, M. Marceau, S. Poirer, M. Chamaillard, B. Pot, M. Simonet and C. Daniel. 2007b. Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology*, 133:862-74.

Barreau F, U. Meinzer, F. Chareyre, D, Berrebi, M. Niwa-Kawakita, M. Dussailant, B. Foligné, V. Ollendorff, M. Heyman, S. Bonacorsi, T. Lesuffleur, G. Sterkers, M. Giovannini, JP. Hugot. 2007. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *Plos One*, 2(6):e523

Foligné B., G. Zoumpopoulou, J. Dewulf, A. Ben Younes, F. Chareyre, J.C. Sirard, B. Pot and C. Grangette. 2007. A key role of dendritic cell in probiotic functionality. *Plos One* 2:e313

Drouault-Holowacz, S., B. Foligné, V. Dennin, D. Goudercourt, K. Terpend, A. Burckel and B. Pot. 2006. Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance: *In vitro* and *in vivo* considerations. *Clin. Nutr.*, 25:994-1003.

- Foligné B.**, S. Nutten, C. Grangette, V. Dennin, D. Goudercourt, S. Poiret, J. Dewulf, D. Brassard, A. Mercenier and B. Pot. 2007. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, 13:236-43.
- Foligné B.**, S. Nutten, L. Steidler, V. Dennin, D. Goudercourt, A. Mercenier and B. Pot. 2006. Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: Technical and microbiological aspects. *Dig. Dis. Sci.*, 51:394-404.
- Foligné B.**, Grangette G and Pot B. 2005. Probiotics in IBD: mucosal and systemic routes of administration may promote similar effects. *Gut*;54:727-728.
- Marceau M, Dubuquoy L, Caucheteux C, **Foligné B.**, Desreumaux P and Simonet M. 2004 *Yersinia pseudotuberculosis* Anti-inflammatory Components Reduce TNBS-Induced Colitis in mouse. *Infection and Immunity*. 72(4)2438-41
- Foligné B.**, Sénégas-Balas F, Cursio C, Cayuela C, Rolf-Petersen N, Antoine JM, Balas D. 2004. Trophic status of the small intestine in young and aged rats: modulation by a Yogurt's supplemented diet. *Dig Dis Sci*. 49(8): 1291-1301.
- Mercenier, A., P. Hols, Y. Roussel, G. Perez-Martinez, J. Buesa, M. Wilks, G. Pozzi, E. Remaut, L. Morelli, C. Grangette, V. Monedero, E. Palumbo, **B. Foligne**, L. Steidler, and S. Nutten. 2004. Screening and construction of probiotic strains with enhanced protective properties against intestinal disorders. *MEDH: Microbial Ecology in Health and Disease (Suppl.)*, 16:86-95.
- Foligné B.**, Sénégas-Balas F, Cursio C, Cayuela C, Rolf-Petersen N, Antoine JM, Balas D. 2003. Consequences of Adrenalectomy on small intestine trophic parameters in aged rats contrast with young ones : evidence of a defective adaptation by aging and lack of corticoids. *Dig Dis Sci*. Jun;48(6):1147-58
- Foligné B.**, Aissaoui S, Senegas-Balas F, Cayuela C, Bernard P, Antoine JM, Balas D. 2001. Changes in cell proliferation and differentiation of adult rat small intestine epithelium after adrenalectomy: kinetic, biochemical, and morphological studies. *Dig Dis Sci*. 46:1236-46.

Communications Orales & Posters

Can probiotics influence gut immunity? The proof is in the eating...".

B. Pot and **B. Foligné**. Invited presentation at: 16th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health: Korea, august 2009

Selection of candidates probiotic strains protecting against murine acute colitis

Foligné Benoît, Prioult Guérolée, Dennin Véronique, Goudercourt Denise, Pot B, Rochat Florence and Mercenier Annick.

Club des Bactéries Lactiques / Rennes, 13-15 Novembre 2007.

Foligné B., E. Macho Fernandez, G. Zoumpopoulou, J. Dewulf, A. Ben Younes, F. Barreau, J.C. Sirard, B. Pot and C. Grangette. Probiotic-induced regulatory dendritic cells prevent colitis through TLR2 and NOD2 signaling. *CFCD- cellules dendritiques et Inflammation- Paris, France, 2007.*

Foligné B., E. Macho Fernandez, G. Zoumpopoulou, J. Dewulf, F. Barreau, J.C. Sirard, B. Pot and C. Grangette. Probiotic-induced regulatory dendritic cells prevent colitis through TLR2 and NOD2 signalling. 15^{ème} Colloque du Club des bactéries lactiques, CBL, Rennes, France. 2007

Foligné B., E. Macho Fernandez, G. Zoumpopoulou, J. Dewulf, A. Ben Younes, F. Barreau, J.C. Sirard, B. Pot and C. Grangette. 'Propriétés anti-inflammatoires des probiotiques: Rôle des cellules dendritiques', Invited lecture at the 'Première journée d'animation scientifique MICALIS- INRA Interaction micro-organisme, Mai 2007, Jouy-en-Josas, France

Crosstalk of epithelial and dendritic cells in a co-culture transwell model after simulation by bacteria. Zoumpopoulou G., **B. Foligné**, E. Tsakalidou, B. Pot and C. Grangette. 59th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens, Greece, 2007.

Therapeutic potential of *Yersinia* anti-inflammatory components.

Foligné Benoît, Rodrigue Dessein, Michaël Marceau, Sabine Poirer, Mathias Chamillard, Bruno Pot, Michel Simonet and Catherine Daniel. 9th International Symposium on *Yersinia*, Lexington October 2006.

Selection of candidates probiotic strains protecting against murine acute colitis

Mercenier Annick, **Foligné Benoît**, Prioult Guérolée, Dennin Véronique, Goudercourt Denise, Pot B and Rochat Florence.

39th Annual meeting, European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), Dresden, June 2006.

Anti-inflammatory potential of a probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance : *In vitro* and *in vivo* considerations. Drouault-Holowacz Sophie, **Foligne Benoît**, Dennin Véronique, Goudercourt Denise, Burckel André, Pot Bruno.

La santé par les probiotiques, Symposium international, Montréal, Octobre 2006.

Zoumpoulou G., **B. Foligné**, K. Christodoulou, C. Grangette, B. Pot and E. Tsakalidou Probiotic potential of lactic acid bacteria. *In vitro* screening and *in vivo* assessment. 2nd International Congress on Bioprocesses in Food Industries, Patras, Greece, 2006.

Foligné B., S. Nutten, C. Hermann, J. Dewulf, F. Chareyre, P. Hols, J.C. Sirard, A. Mercenier, B. Pot and C. Grangette.. Anti-inflammatory properties of probiotics: role of bacterial cell-wall components and interaction with dendritic cells. 5th meeting of the European Mucosal Immunology group, Prague, Czech republic, 2006.

Zoumpoulou G., **B. Foligné**, K. Christodoulou, C. Grangette, B. Pot and E. Tsakalidou Probiotic lactic acid bacteria in *Salmonella* infection and colitis mouse models. From *in vitro* screening to *in vivo* confirmation. The 20th International ICFMH Symposium. Food safety and food biotechnology diversity and global impact, Bologna, Italy, 2006.

Correlation between *in vitro* and *in vivo* immuno-modulatory properties of Lactic acid bacteria. **Foligné Benoît**, Nutten Sophie, Grangette corinne, Dennin Véronique, Joëlle Dewulf Annick Mercenier and Pot Bruno.

Yakult Symposium, Genth, October 2005, **Poster Award**

Foligné B., S. Nutten, C. Grangette, V. Dennin, J. Dewulf, A. Mercenier and B. Pot. 2005. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immuno-modulatory properties of Lactic acid bacteria. Euprobio, Krakow, Poland, October 2005

Grangette C., S. Nutten, **B. Foligné**, E. Palumbo, J. Dewulf, S. Morath, C. Hermann, T. Hartung, P. Hols, B. Pot and A. Mercenier. Impact of teichoic acids on the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory capacities of lactic acid bacteria. Euprobio, Krakow, Poland, October 2005.

In vitro effect of commercial probiotic product isolates and reference strains of Bifidobacterium on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. Masco L., Pot B., **Foligné B.**, Grangette C., Huys G. and Swings J. 3rd Prebiotics, probiotics & New Food, Rome, September 2005.

Relationships between *in vitro* and *in vivo* immuno-modulatory properties of Lactic acid bacteria. **Foligné Benoît**, Grangette corinne, Dennin Véronique, Joëlle Dewulf and Pot Bruno. 4th NIZO Dairy conference, Papendal, Netherlands, June 2005,

Probiotic Strain composition influences *in vivo* Immunomodulation potential. Dennin Véronique, **Foligné Benoît**, Dominique Brassart, Gregory Leyer and Pot Bruno. ASM, Atlanta, April 2005,

Role of cell wall components in the strain specific immunomodulation properties of LAB: specific impact of teichoic acids on the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties of *L. plantarum*. Grangette Corinne, **Foligné Benoît**, Emanuelle Palumbo, Dennin Veronique, Nutten Sophie, Joelle Dewulf, Siegfried Morath, Corinna Hermann, Gregory Leyer, Thomas Hartung, Pascal Hols, Bruno Pot and Annick Mercenier.

12th International congress of mucosal immunology group meeting, Boston, June 2005

Relations entre les propriétés immunomodulatrices des bactéries lactiques *in vitro* et la modulation de la réponse inflammatoire *in vivo*. **Foligné Benoît**, Nutten Sophie, Dennin Véronique, Goudercourt Denise, Mercenier Annick and Bruno Pot.

XIII^{ème} Rencontres de Nutrition Danone, Paris, Novembre 2004.

Immuno-modulation properties of lactic acid bacteria: from mechanism of action to therapeutic application. Grangette Corinne, **Foligné Benoît**, Emanuelle Palumbo, Nutten Sophie, Dennin Véronique, Leyer Gregory, Hols Pascal, Mercenier Annick and Pot Bruno.

4th european mucosal immunology group meeting (EMIG 2004), Lyon, Octobre 2004.

Immuno-modulation properties of lactic acid bacteria : from mechanism of action to therapeutic application. Grangette Corinne, **Foligné Benoît**, Emanuelle Palumbo, Nutten Sophie, Dennin Véronique, Leyer Gregory, Hols Pascal, Mercenier Annick and Pot Bruno.

12th international immunology congress, Montréal, Canada, juillet 2004.

La protéine REG1 a est une protéine du desmosome dans la lignée Caco-2. F Sénégas-Balas, J Carrère, P Bernard, B Dycke, M Diallo, **B. Foligné**, O Guy-Crotte, F Figarella, D Balas. XIX^{ème} réunion du CECED, Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives, Toulouse, Janvier 2001.

Small intestinal trophic disorders generated by adrenalectomy in a rat model.

Foligné Benoît, Sénégas-Balas Françoise, Cayuela Chantal, Antoine Jean-Michel and Balas Daniel.

Fermented food and healthy digestive functions symposium, Mexico, may 2001.

A young and aged rat model of small intestine trophic disorders generated by adrenalectomy. **Foligné Benoît**, Sénégas-Balas Françoise, Cursio Raffaële, Rolf-Petersen Nathalie, Cayuela Chantal, Antoine Jean-Michel and Balas Daniel.

1st Congress of the International Academy on Nutrition and Aging, Paris, juin 2001.

et

Géronto-Nice 2001, XXXI Journées Régionales de la Société Française de Gériatrie, Nice, mai 2001.

Travaux de Recherche

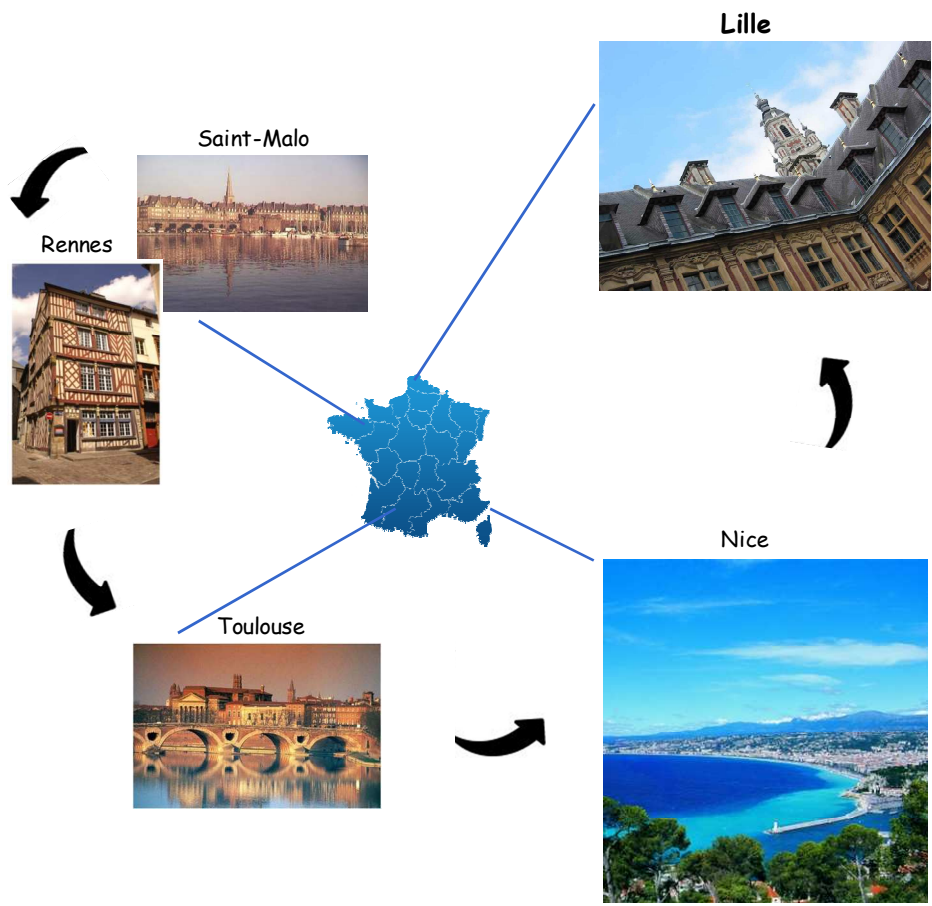


Figure 1 : Chronologie et géographie de mon parcours scientifique.

Parcours Scientifique et Présentation

Parcours Scientifique

Si un parcours de formation est relativement facile à présenter sur un plan chronologique et géographique (figure 1), il n'est pas toujours si aisé d'en illustrer le « cheminement » scientifique correspondant, au gré des rencontres et des choix plus ou moins conditionnés par les circonstances de la vie. Toutefois, il est souvent possible d'y retrouver une certaine cohérence, le « naturel » et l'imprégnation originelle finissant généralement par s'adapter à l'environnement, en y puisant les richesses et minimisant les aléas, comme c'est le cas, nous le verrons, pour l'écosystème intestinal.

D'une formation initiale de biochimiste, j'ai su conserver une curiosité dans les aspects techniques des diverses méthodes de dosages, la compréhension des principes mis en œuvre et leur optimisation. Paradoxalement, c'est pourtant l'histologie qui a constamment accompagné mes travaux, développant un goût prononcé pour l'imagerie tissulaire et la « visualisation » des pathologies. Qu'il s'agisse de la détection des médiateurs de l'inflammation cutanée (hybridation *in situ* d'ARNm de cytokines sur explants humains irradiés) lors de mon DEA ; des aspects morphométriques de l'intestin grêle de rats jeunes et âgés, durant ma thèse ou encore de l'évaluation microscopique des atteintes tissulaires dans des colites murines, abordée pendant mon post-doctorat ; la microscopie a effectivement contribué pour une grande part dans un parcours caractérisé par la mise en œuvre de modèles pathologiques *ex-* et surtout *in vivo*.

Au-delà des aspects techniques, une constante de mon activité de recherche est la thématique, axée sur la fonctionnalité de la « sphère digestive » et ses agressions. En effet, le fil conducteur de mes travaux se concentre sur les perturbations de l'homéostasie intestinale, l'adaptation de cet écosystème et les possibilités d'intervention pour corriger ou limiter ces agressions. Les origines de ces perturbations sont multiples : concernant le Stress et la dénutrition (thèse et projet futur de recherche), l'inflammation (post-doctorat et futur projet de recherche), les infections gastro-intestinales (post-doctorat et projet futur de recherche) ainsi que l'action néfaste de certains xénobiotiques (principal futur projet de recherche).

Je dois mentionner ma formation à l'école doctorale de Biologie du Vieillessement (Paris 7) qui, au-delà d'une thématique qui m'est chère, aborde les grandes fonctions et systèmes de l'organisme jusqu'au niveau moléculaire, sous l'angle des pathologies et atteintes liées à l'âge. Cette formation généraliste, au delà d'une spécialisation souvent nécessaire aujourd'hui (immunologie, microbiologie, ...), a toutefois le mérite de suggérer une prise en compte globale de l'individu, dans son contexte et sa dynamique ainsi qu'en y intégrant son vécu environnemental.

Enfin, un trait important jalonnant ce parcours est une recherche concrète et appliquée expliquant la proximité des acteurs industriels ; qu'il s'agisse de mon DEA au sein des Laboratoires Pierre Fabre, de ma thèse financée par le centre de Recherche Danone et de la seconde partie de mon Post-doctorat à l'IPL, largement supporté par le Centre de Recherche Nestlé. C'est d'ailleurs en grande partie à ce dernier partenariat que je dois d'avoir été recruté à l'institut pour poursuivre cette recherche appliquée tout en développant des axes plus fondamentaux.

Présentation

Après avoir précisé quelques points essentiels du contexte général de mon activité de recherche, en guise d'introduction, certains aspects « représentatifs » ont été choisis délibérément, sans reprendre ni détailler l'ensemble de mes travaux. Cette présentation de manière relativement chronologique s'attachera à illustrer les divers aspects de mon approche de l'écologie intestinale pour ensuite présenter les suites et perspectives nouvelles que j'entends développer.

Enfin, je n'oublie pas la dimension pédagogique et humaine du travail de recherche et préciserai brièvement l'attachement que je porte à la transmission mutuelle des savoirs et aux valeurs qui me semblent essentielles à atteindre, ou du moins, à s'en approcher, dans cette noble profession.

Introduction générale

Homéostasie & Allostasie de l'Ecosystème intestinal : une dynamique adaptative, des agressions variées, des interventions multiples ...

Une introduction est forcément limitée et présenter les divers aspects abordés dans mon activité de recherche implique de faire des choix. Un cours général n'est pas l'objet ici, d'autant qu'il faudrait pour être complet décrire successivement :

Les relations "structure-fonction" du tissu intestinal, avec les spécificités respectives à chaque étage de l'intestin grêle, du colon, et selon la dynamique temporelle (allant du développement au vieillissement), ...

L'écosystème intestinal dans son ensemble, incluant entre autres, un descriptif du microbiote, de l'immunité innée au sein du tractus intestinal, ...

Les interactions du système digestif avec les autres fonctions (nutrition, système neuroendocrinien, immunitaire, ...)

Les concepts de Stress et d'adaptation, d'homéostasie et de charge allostatique,

L'inflammation au sens large, et les maladies inflammatoires chroniques/cryptogénétiques de l'intestin (MICI), ...

Les infections gastro-intestinales et leur clinique, ...

Les différents modèles expérimentaux, leurs intérêts et leurs limites ...

Les Probiotiques ; historique et preuves de concept, applications diverses et mécanismes associés ...

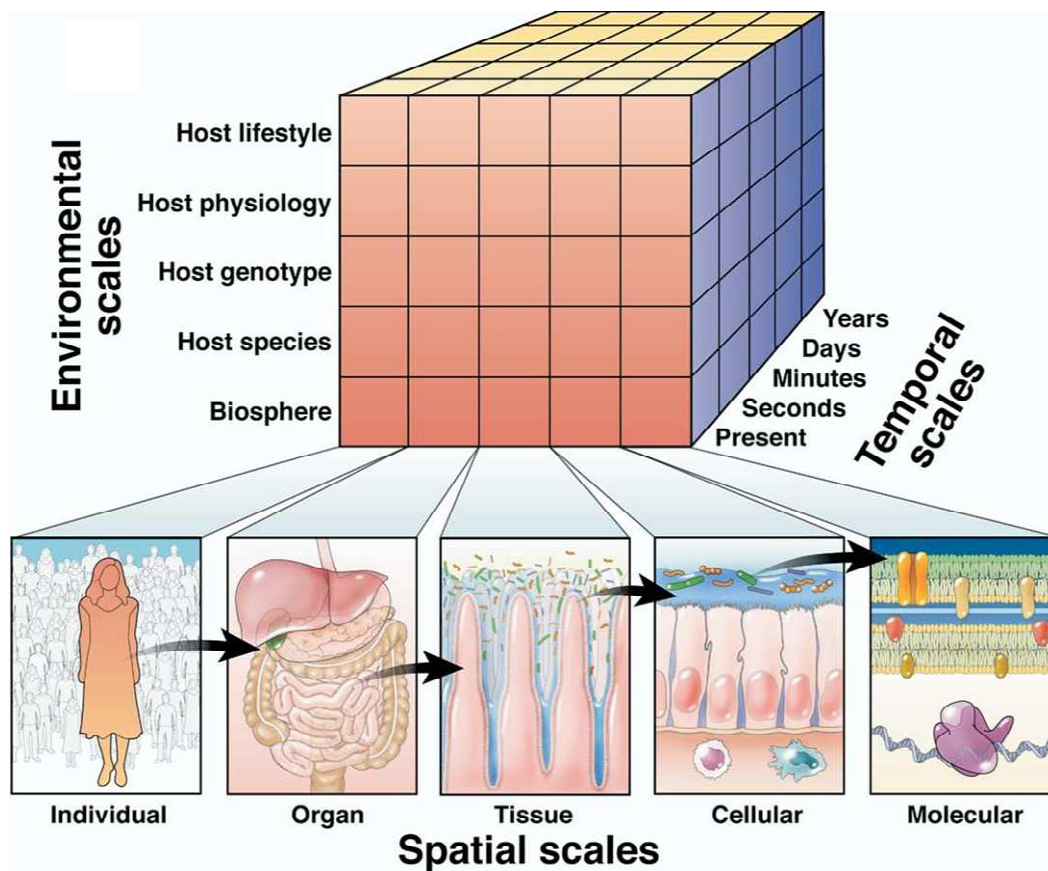
Les bactéries lactiques, leurs structures et propriétés, leur utilisation comme vecteurs de molécules (bactéries lactiques recombinantes), ...

...

Des revues générales de grande qualité abordent précisément tous ces aspects ; Plutôt que de les synthétiser, j'ai préféré ici rappeler seulement certains des éléments "clefs" inhérents aux différents domaines de mon activité de recherche et énumérer quelques définitions et généralités issues de revues récentes.

De manière non-exhaustive, cette sorte de "Glossaire illustré" veut surtout souligner la complexité de quelques uns des contextes pris séparément ; imposant d'autant plus, une grande humilité dans l'approche globale et intégrée des interactions entre ces différentes notions ...

Délibérément, je ne réintroduis pas les aspects concernant les probiotiques, maladies inflammatoires intestinales et les modèles animaux, ceux-ci étant présentés de manière transversale dans mes différents travaux.



D'après Camp *et al.* (2009)

Figure 2 : Echelles en écologie microbienne du tractus digestif. L'écosystème gastro-intestinal peut se conceptualiser en un espace à 3 dimensions défini par ses variations sur des échelles environnementales, spatiales et temporelles.

Les échelles environnementales sont définies par des variations affectant l'ensemble l'environnement intestinal, incluant les variations de la biosphère, selon l'espèce de l'hôte considéré, son génotype, son phénotype et son mode de vie. Les échelles spatiales définissent la résolution de perception de cet écosystème intestinal, de l'individu à la molécule. Enfin, les échelles temporelles rendent compte des variations selon le stade de développement et des répercussions dans le temps, allant de l'ordre de la seconde à des impacts sur plusieurs années.

L'Ecosystème Gastro-intestinal :

Une structure complexe et dynamique ...

L' Ecosystème Intestinal

L'écosystème intestinal est d'une complexité insoupçonnée et probablement l'un des systèmes les plus dynamiques qui soient. En effet, les différents éléments qui le composent (le tissu intestinal représenté par les cellules de l'hôte, la flore microbienne auxquels on peut rajouter les nutriments) sont eux même séparément très variés selon leur localisation, dans le temps et en fonction des conditions environnementales et des individus. Il y a par conséquent plusieurs échelles de lecture de cet écosystème et de ses variations (figure 2).

Le tissu intestinal

Sans négliger l'importance d'organes du tractus digestif tels l'œsophage, l'estomac, le foie, ni celle d'autres glandes et structures annexes (vésicule biliaire, appendice/caecum, ...), l'exemple seul de la structure de l'intestin grêle souligne déjà cette complexité. L'épithélium constitué de plusieurs types cellulaires (figure 3) est lui-même organisé différemment selon les différentes portions (duodénum, jéjunum et iléon), ayant chacune leurs caractéristiques. La surface d'échange réalisée par les replis de la muqueuse, les villosités en « doigts de gants » (figure 4), atteint près de 300 m², sans considérer les microvillosités.

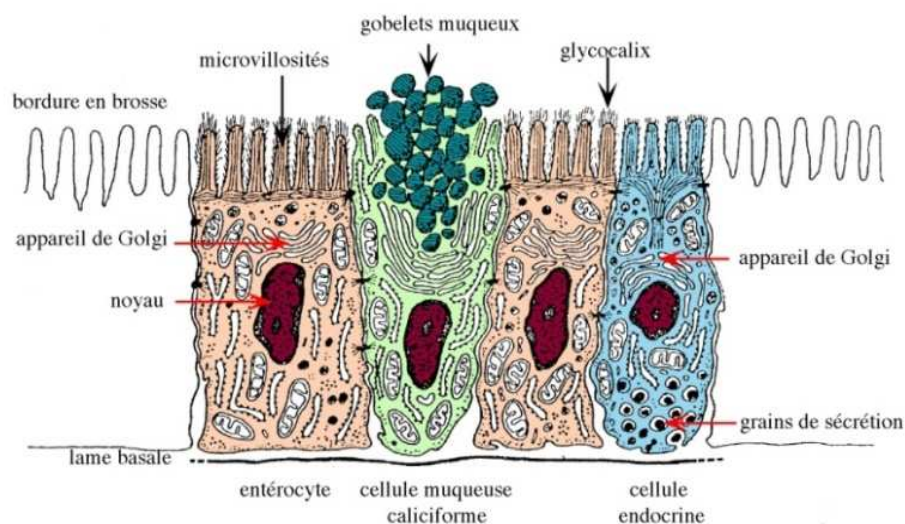


Figure 3 : Différents types cellulaires de l'épithélium intestinal, (d'après Frexinos *et al.*, 1991)

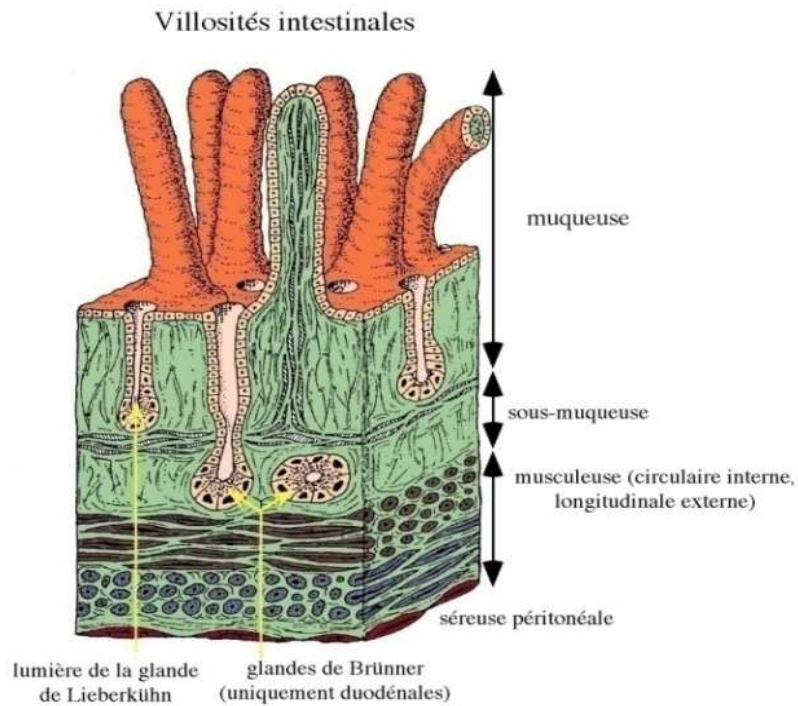


Figure 4 : La paroi de l'intestin grêle, (d'après Frexinos *et al.*, 1991)

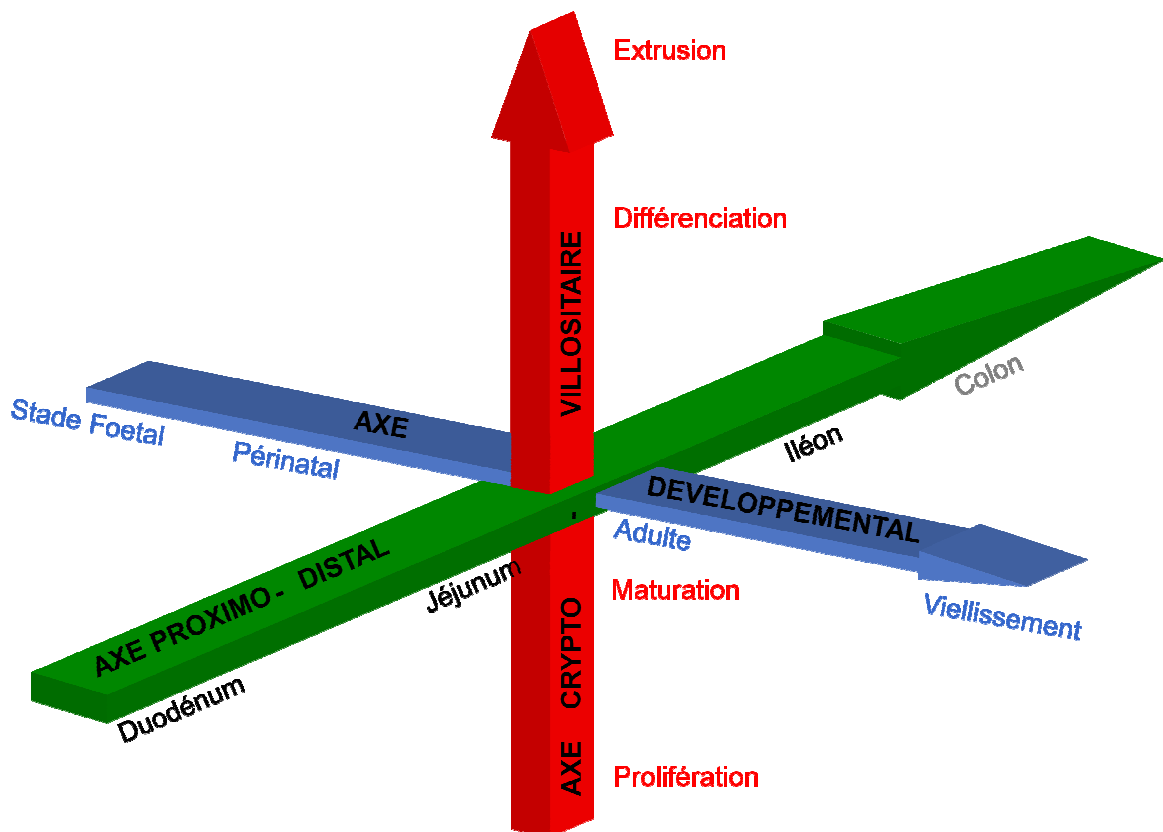


Figure 5 : Différents axes spatio-temporels sont à considérer dans l'intestin grêle. (Foligné B, Thèse de doctorat, modifié d'après Simon-Assman et Kedingner 2000)

D'un point de vue dynamique, on considérera donc plusieurs axes au sein de l'intestin grêle (figure 5) :

- un axe « oral-distal », allant du duodénum vers le colon ; villosités de plus en plus courtes et moins effilées, spécificité des types cellulaires selon les étages, avec une augmentation progressive du nombre de cellules muqueuses et de cellules de Paneth, une spécificité du type d'enzymes digestives et de l'environnement microbien.
- un axe de différenciation crypto-villositaire, illustrant le formidable dynamisme de l'épithélium ; les cryptes sont le siège de nombreuses activités mitotiques assurant la formation des villosités, le renouvellement des entérocytes allant de la maturation à l'extrusion dans la lumière intestinale se réalisant sur 3 à 6 jours chez l'homme.
- un axe développemental, évoluant du stade fœtal au vieillissement de l'individu, subissant lui aussi des variations propres à chaque étage.

Enfin, le colon a ses propres particularités structurales, fonctionnelles et métaboliques. Lui aussi est subdivisé en plusieurs étages distincts associés à une flore spécifique (voir plus loin). On peut insister sur l'absence de villosités, de cellules de Paneth et de plaques de Peyer, avec par contre de très nombreuses cellules caliciformes, sécrétant une importante quantité de mucus souvent négligée (figure 6).

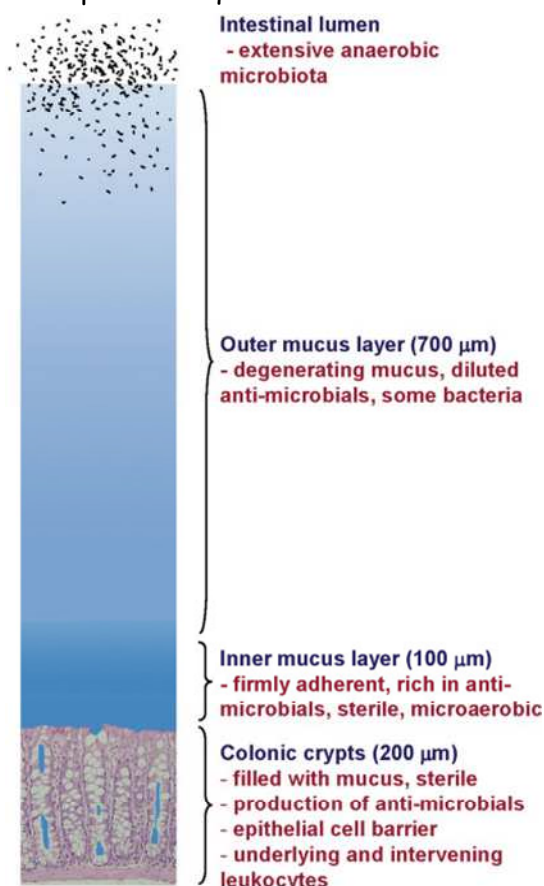
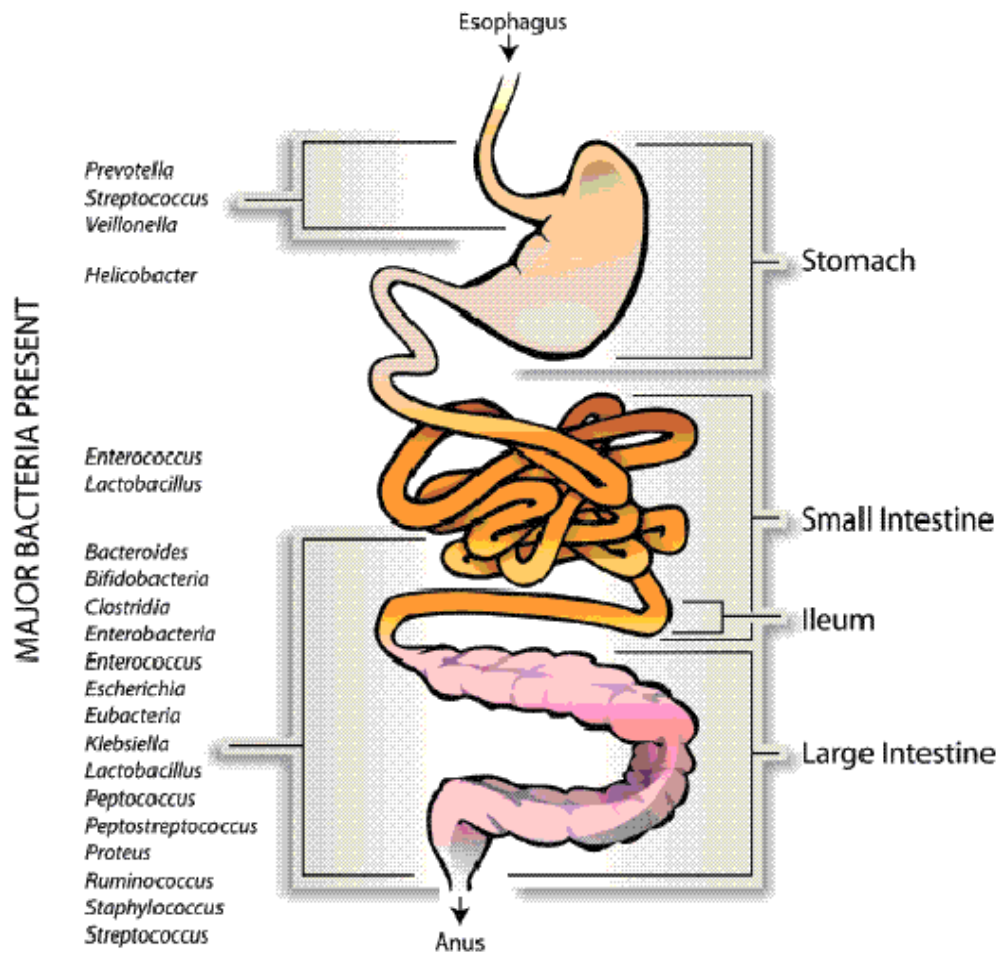


Figure 6 : Représentation schématique de la barrière muqueuse du colon chez la souris, évoquant l'épaisseur de la barrière de mucus et les relations entre la lumière et l'épithélium (McGuckin *et al.*, 2009).



* Microbial Interactions with Humans. Chapter 21: 700-725. In: Madigan MT, Martinko JM. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Prentice Hall, 2005.

Figure 7 : Diversité et distribution des principaux microorganismes non pathogènes présents chez l'homme sain.

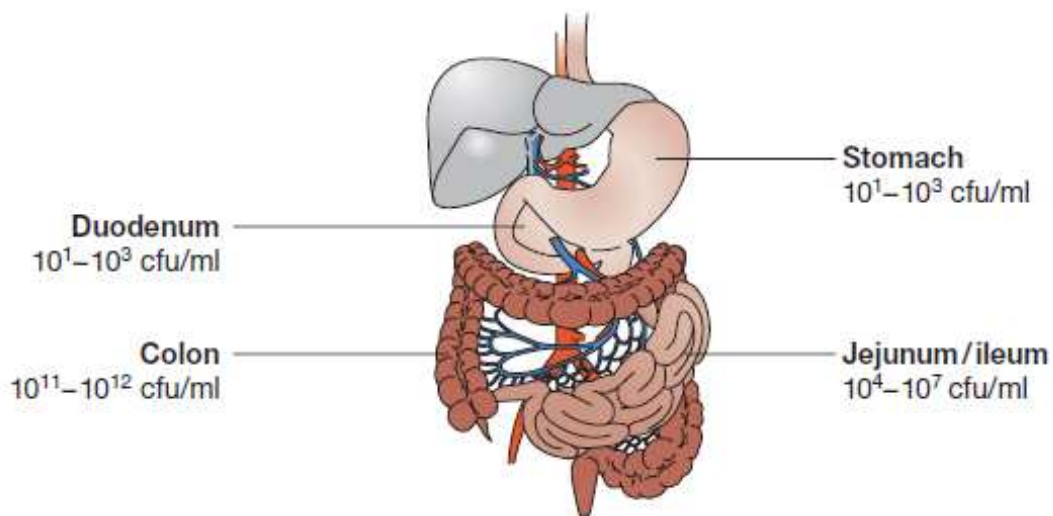


Figure 8 : Distribution de la biomasse bactérienne chez l'homme sain. (O'Hara *et al.*, 2006)

La flore digestive :

Des chiffres vertigineux- cachés en profondeur ...

Le nombre de cellules microbiennes résidant à la surface et dans le corps d'un homme adulte est très supérieur au nombre total de cellules somatiques et germinales d'un individu (10 à 20 fois) ; la majorité est présente dans le tractus digestif (10^{13} à 10^{14} cellules microbiennes).

Le tissu intestinal est donc en contact continu avec un grand nombre d'organismes procaryotes ; bactéries commensales (figure 7) et leurs phages, mais aussi d'autres organismes eucaryotes (levures et champignons) et de virus. La biomasse correspondante représente au total plus de 1.5 kg pour un adulte.

La densité bactérienne, encore faible au début de l'intestin grêle, augmente le long du tractus pour atteindre au colon une quantité jamais égalée dans aucun autre écosystème (10^{12} cfu/g, figure 8 ci-contre et figure 9 ci-dessous).

Représentation schématique de la microflore

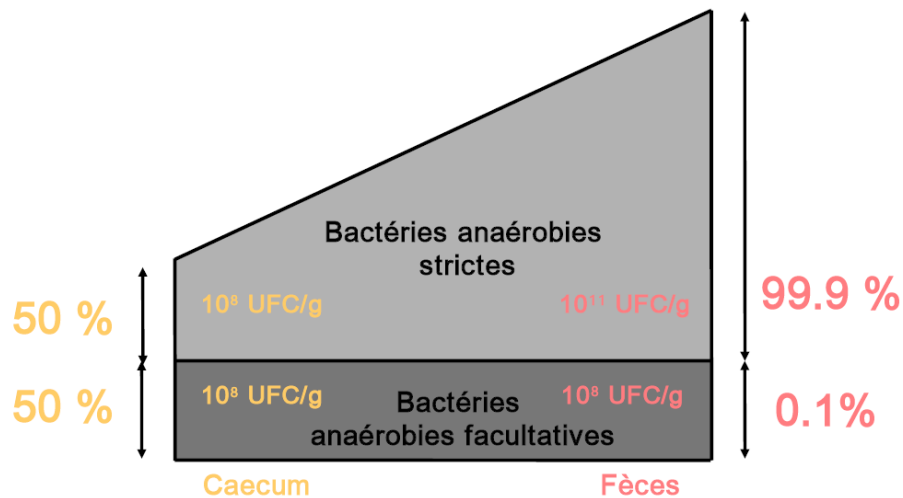


Figure 9 : Richesse de la microflore anaérobie.

Très peu de données existent quant à la localisation et à la spécificité cryptovillositaire de la flore.

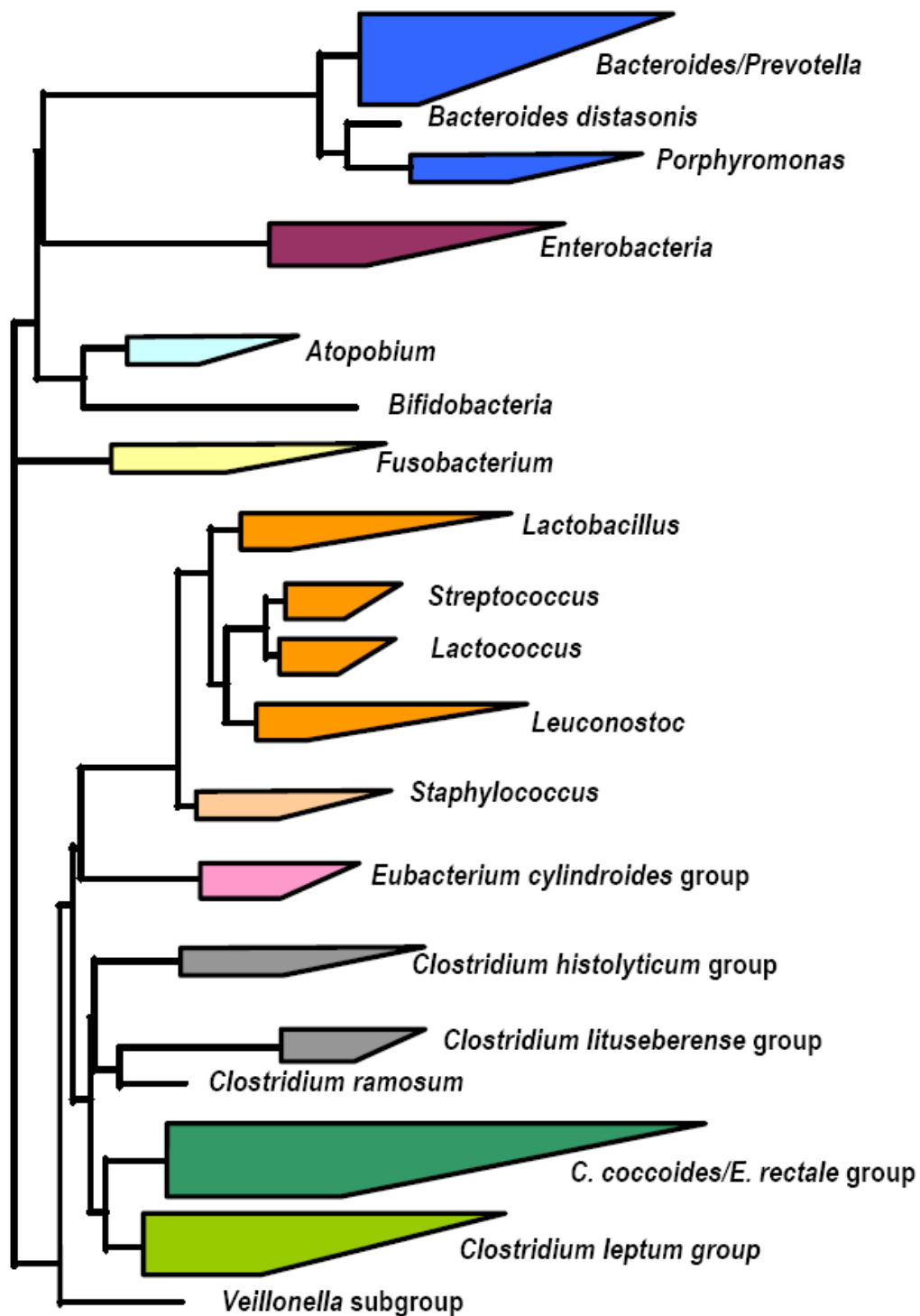


Figure 10 : Arbre phylogénétique présentant les groupes bactériens principaux ayant des représentants dans la microflore fécale dominante de l'homme adulte en bonne santé (d'après Blaut *et al.*, 2002).

Au-delà du nombre restreint d'espèces cultivables (10 à 20 %), la diversité des populations, basée sur les analyses d'unités taxonomiques, a longtemps estimé à 400 à 500 espèces bactériennes. Plus récemment, les méthodes moléculaires considèrent environ 2000 représentants différents d'organismes bactériens commensaux dans le corps, pour seulement 100 espèces connues de pathogènes (Neish *et al.*, 2009).

La majeure partie de cette communauté est « autochtone », c'est-à-dire indigène et stable ; toutefois, il existe de nombreuses espèces transitoires dites allochtones, provenant de l'alimentation et de l'environnement. On retrouve les 3 domaines "Bactéries, Eucaryotes et Archaea". Les phyla bactériens les plus représentatifs sont les Firmicutes et les Bactéroidetes ; on retrouve ensuite les Actinobactéries, fusobactéries et des Cyanobactéries, puis des genres moins abondants voire anecdotiques. Au total, 10 des 70 phyla bactériens sont représentés, à la fois par des bactéries aérobies et anaérobies (figures 9 et 10). Si l'on considère ces rares représentants et les espèces transitoires, ce sont plus de 15,000 espèces bactériennes associées au tractus gastro-intestinal (Camp *et al.*, 2009).

Au contraire, l'intestin est dominé par une espèce unique représentante des Archaea : *Methanobrevibacter smithii*, avec toutefois une activité métabolique lui conférant un rôle très important pour l'écosystème intestinal.

Enfin, les représentants eucaryotes du microbiote, de faible diversité, ont des rôles qui restent encore à définir parmi la communauté microbienne.

La flore microbienne est par conséquent très complexe et sa composition varie selon les étages intestinaux, les compartiments superficiels ou profonds, les individus mais aussi les conditions physiologiques normales et pathologiques de l'individu, son régime alimentaire, ses pathologies et les agressions diverses qu'il subit au cours du temps, du stade fœtal au vieillissement ...

Certains points clefs concernant cette flore, issus d'un rapport d'experts académiques et industriels pour l'Afssa (2005) peuvent être rappelés, notamment :

Un profil de flore spécifique à chaque individu (y compris pour des jumeaux homozygotes).

Une stabilité de la flore dominante (au moins 1% de la flore totale) et une relative instabilité de la flore sous-dominante.

Une augmentation de la complexité de la flore avec l'âge.

Au total, devant les 25 à 30 000 gènes eucaryotes de l'homme, le microbiote représente un métagénome de plus de 2 millions de gènes ...

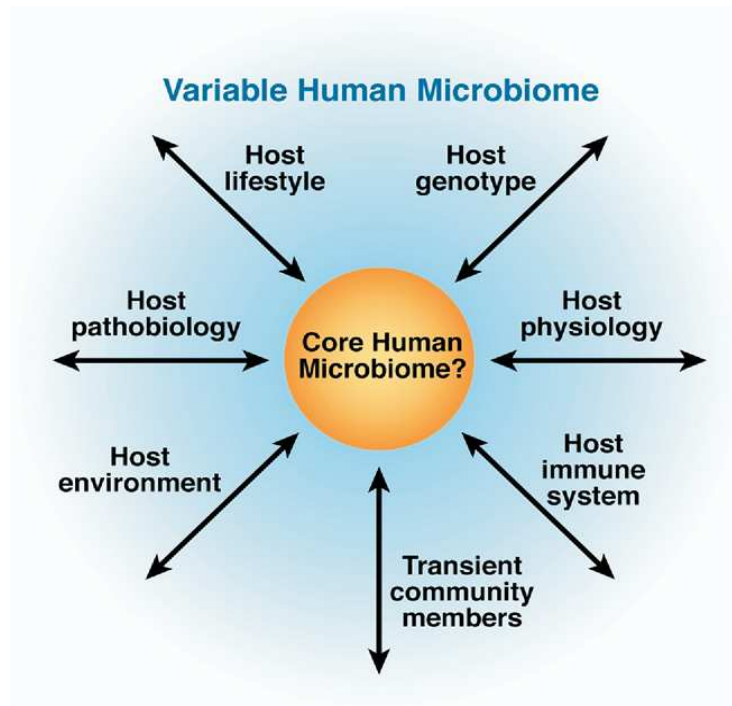


Figure 11 : Interactions multiples du microbiote avec l'hôte soulignant son implication essentielle dans la physiologie intestinale et la santé humaine (Preidis et Versalovic, 2009).

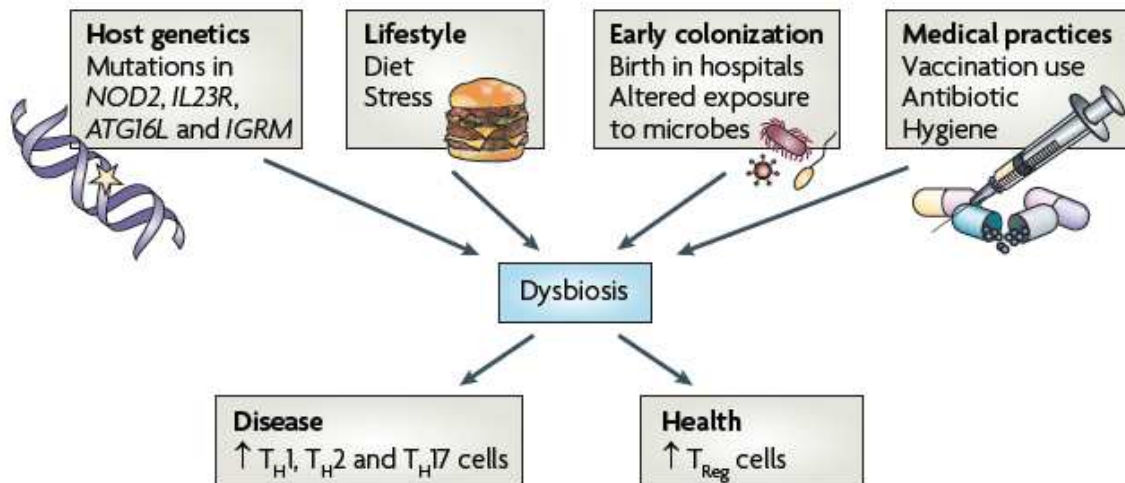


Figure 12 : Principales causes de dysbioses du microbiote (Round et Mazmanian, 2009)

Des fonctions essentielles et insoupçonnées ...

La flore intestinale organise une réelle symbiose qui s'est façonnée au cours de l'évolution. Des associations « hôte-bactéries » se sont développées en relations bénéfiques, créant ainsi un mutualisme fort dans la partie basse de l'intestin des mammifères. Bien au-delà d'une simple coexistence, les multiples rôles du microbiote permettent notamment de fournir des nutriments essentiels à l'hôte, de métaboliser des composés non-digestibles et de contribuer aux défenses en empêchant la colonisation par des pathogènes opportunistes. Une autre fonction cruciale de la flore est sa contribution au développement du tissu intestinal et de son architecture (Hooper et Gordon, 2001).

La place de la flore dans le développement du système immunitaire, les réponses immunes innées et adaptatives contribuent également au maintien d'une tolérance et à l'homéostasie de cet écosystème. D'autres fonctions plus récemment décrites montrent un rôle non-négligeable de la flore dans les régulations métaboliques de l'hôte et son équilibre énergétique (Cani and Delzenne, 2009).

On peut effectivement considérer le microbiote comme un réel organe complémentaire (O'hara et Shanahan, 2006), exerçant de multiples fonctions « régulatrices » de l'hôte en bonne santé. En retour, la flore subit également l'influence de l'hôte (figure 11). De cet équilibre maintenu ou rompu pourraient s'établir les conditions de nombreuses pathologies, immunes ou métaboliques (figure 12).

De nombreuses évidences associent en effet des flores perturbées à des contextes pathologiques, mais il n'est pas toujours possible de déterminer la causalité de ces « dysbioses » et si l'altération de l'équilibre microbien résulte ou bien est à l'origine de ces pathologies. Ceci explique les initiatives récentes de détermination précise du microbiome humain "The Human Microbiome Project" (Turnbaugh *et al.*, 2007) ou encore le projet européen "Métahit", associant le séquençage du métagénome d'individus sains et de pathologies pour comparer leurs communautés microbiennes respectives. La présence (ou l'absence ...) de certaines bactéries pourrait alors soit prédisposer ou au contraire protéger un individu vis-à-vis d'une affection particulière. Cet aspect intéresse les cellules de l'immunité non-spécifique mais également acquise et suggère, au-delà des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, des infections gastro-intestinales et de l'obésité, un impact indirect plus général sur l'immunité dans des atteintes auto-immunes, certains cancers et allergies (Round et Mazmanian, 2009).

Ce rôle essentiel du microbiote explique la théorie de l'hygiène (Strachan, 1989, Bach, 2002), suggérant qu'une réponse inadéquate aux microbes et dérivés microbiens, associée aux modes de vies industriels trop « propres », soit responsable du développement des maladies auto-immunes et d'affections liées à des dysfonctions immunitaires (asthme, scléroses, arthrites, Maladies inflammatoires de l'intestin).

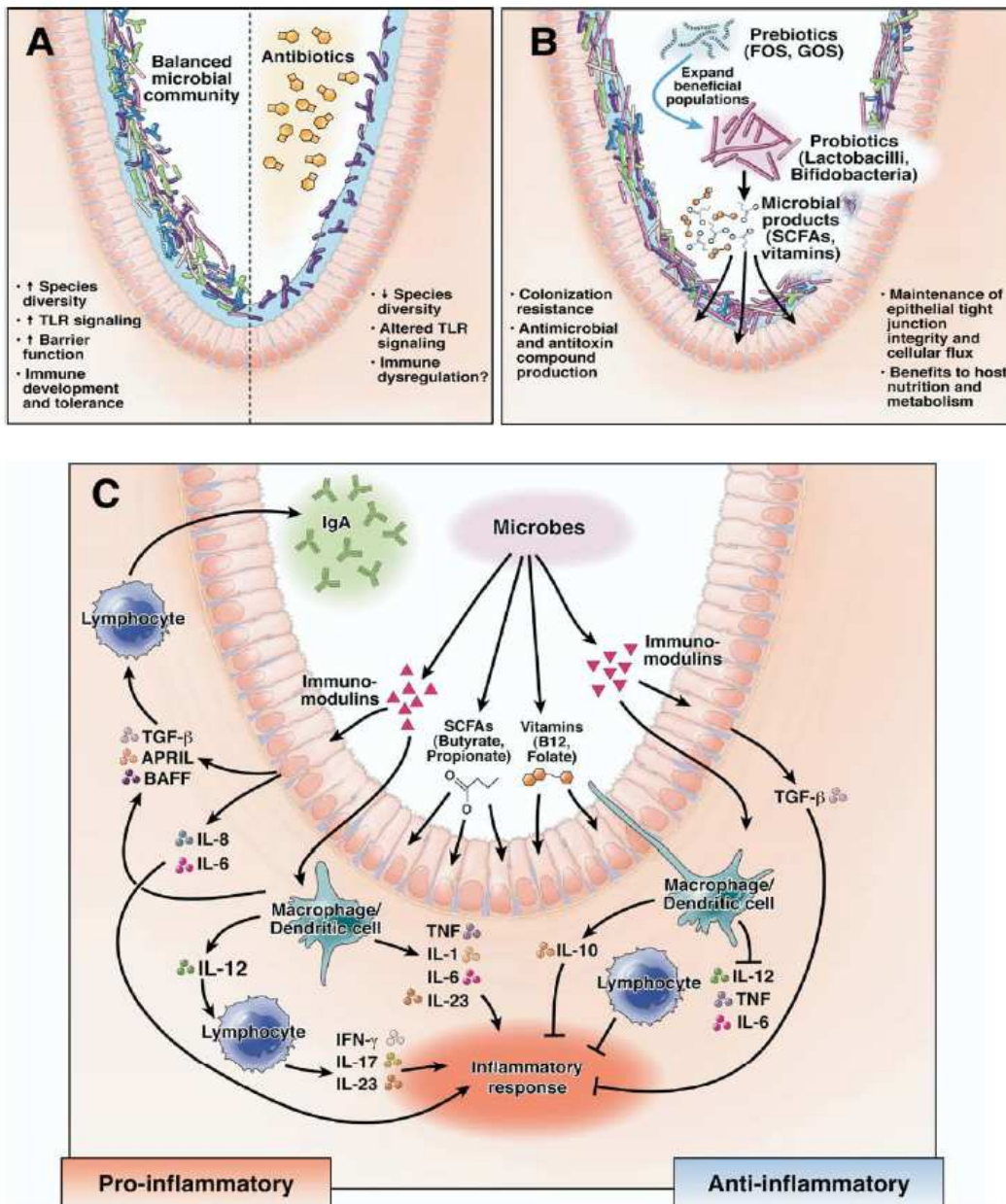


Figure 13 : Effets de la manipulation microbienne sur la biologie intestinale (Preidis et Versalovic, 2009). A : Un traitement antibiotique altère la fonction barrière et la tolérance. B : La manipulation de la flore peut au contraire renforcer la barrière et être bénéfique . C : De nombreuses interactions directes et/ou facteurs sécrétés par des microorganismes interagissent avec l'épithélium et ses cellules immunocompétentes, influençant les réponses immunes innées, adaptatives et l'environnement cytokinique.

La qualité et la diversité de l'espace microbien du compartiment intestinal expliquent donc en partie le maintien des fonctions homéostatiques de l'écosystème intestinal, celui-ci pouvant être rompu sous l'action d'antibiotiques (figure 13 a), ou renforcé par l'utilisation de composés pré-biotiques ou d'organismes probiotiques (figure 13 b). Il en résulte, au sein de la muqueuse, un état pro- ou anti-inflammatoire (figure 13 c)

Des agressions variées, un équilibre fragile ...

L'équilibre inflammatoire est fragile et nécessite à la fois un écosystème microbien et une muqueuse réactive et intègre pour maintenir un état stable de l'écosystème intestinal (figure 14).

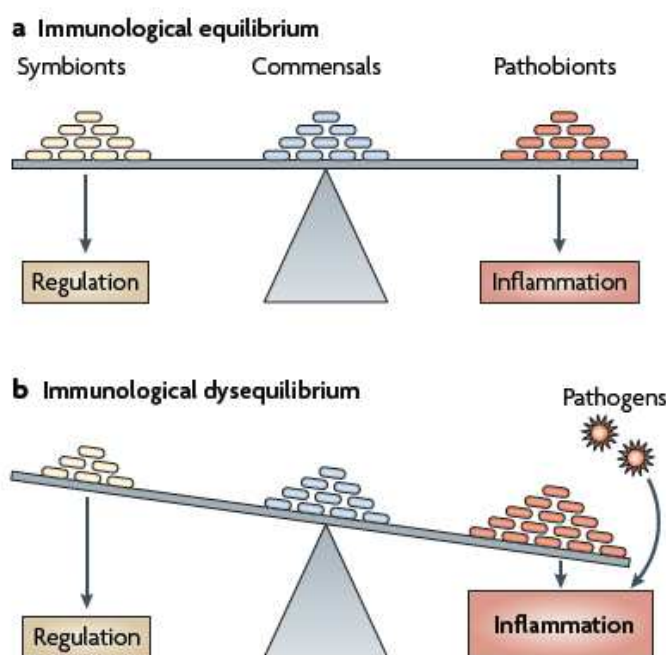


Figure 14 : Déséquilibre immunologique associé à une dysbiose du microbiote (Round et Mazmanian, 2009). **a :** Un microbiote sain est composé de plusieurs classes de bactéries : des **Symbiontes**, ayant des fonctions bénéfiques pour la santé, des **Commensales**, résidents permanents de cet écosystème complexe, ni bénéfiques, ni délétères, et des **Pathobiontes** (potentiellement inducteurs de pathologies. **b :** en cas de dysbiose, la composition du microbiote change en réduisant les symbiontes au profit des pathobiontes. Il en résulte une inflammation non spécifique qui, si elle n'est pas contenue (susceptibilité génétique, personne affaiblie ou immunodéprimée, muqueuse altérée ...,) favorise le développement d'organismes opportunistes et l'apparition d'une inflammation aiguë puis s'installant dans la chronicité.

La flore et la muqueuse intestinale étant indissociables, toute agression ou perturbation de l'un aura des répercussions sur l'autre, sur l'homéostasie intestinale et un impact sur le statut général de l'organisme ...

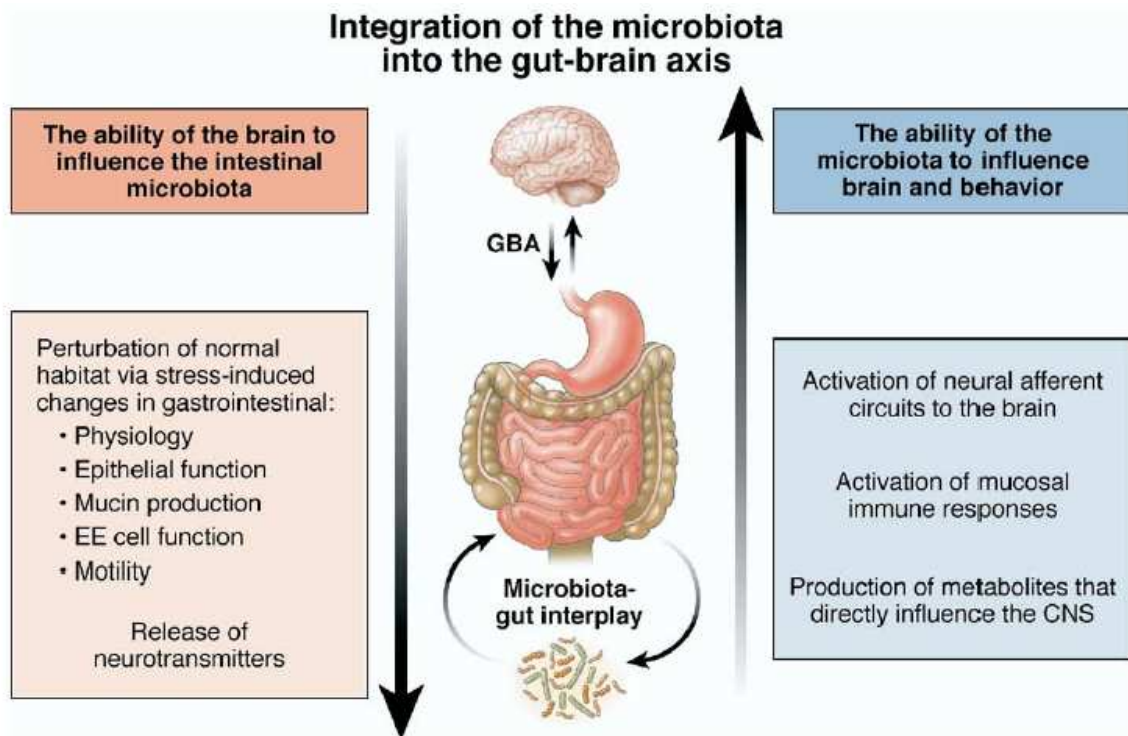


Figure 15 : Rôle du microbiote intestinal dans l'axe « Cerveau-intestin » (GBA), (Colins et Bercik, 2009). CNS : système nerveux central ; EE : Entéro-Endocrine.

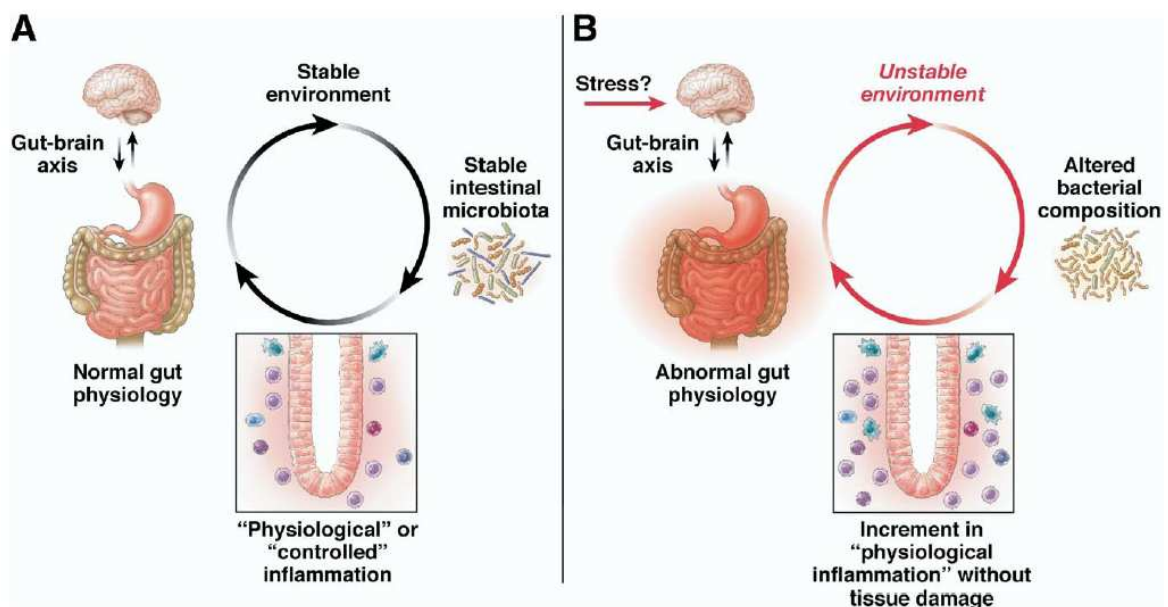


Figure 16 : Relations entre la physiologie gastro-intestinale, le microbiote et l'état d'inflammation : **A** : contrôlée en conditions normales, assurée par une flore stable et une physiologie régulée ou **B** : en cas de perturbation de la physiologie intestinale ou de la composition du microbiote.

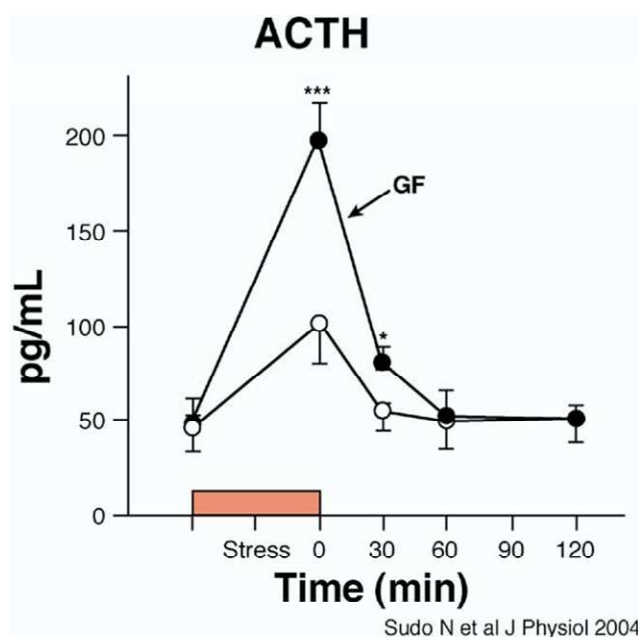
Influence du Stress : l'Axe Cerveau-Intestin

Un exemple fascinant du rôle central de l'écosystème intestinal dans le statut général de l'individu est réalisé par le triangle « *Cerveau-intestin-microbes* » : De très nombreuses études, dans les années 50 et 60, ont montré les conséquences de stress variés, qu'ils soient nutritionnels, physiques et/ou émotionnels, sur l'immunité systémique et les fonctions digestives. Il a été décrit beaucoup plus récemment qu'un dialogue pouvait s'établir en retour entre l'intestin, et notamment la flore, et le système nerveux central (Colins et Bercik, 2009) et que ces dialogues étaient bidirectionnels (figure 15).

On comprend aisément que toute forme externe de Stress s'adressant à l'individu et toute condition influençant la gestion de ce stress (dénutrition, immuno-dépression, vieillissement, infection(s), inflammation, stress oxydatif, ...) aura, éventuellement en plus des effets directs, des conséquences indirectes sur l'écosystème intestinal, créant ainsi les conditions d'une dysbiose et d'une inflammation non contrôlée (figure 16).

« Dans un tel modèle, des facteurs psychologiques, tel le stress ou l'anxiété, ont une influence sur la physiologie intestinale, altérant ainsi l'habitat de la microflore. La microflore va à son tour avoir un impact sur la physiologie intestinale ainsi que sur les défenses immunitaires au niveau de la muqueuse digestive. [...] Des perturbations de la microflore digestive peuvent influencer sur le comportement. Ces données soulèvent l'hypothèse d'un rôle central de la microflore dans le cas de troubles gastro-intestinaux fonctionnels comme le syndrome de l'intestin irritable, pour lequel des perturbations de la flore vont non seulement induire des dysfonctionnements intestinaux, mais pourraient aussi contribuer à la co-morbidité psychiatrique retrouvée chez 60% des patients », Repris par le Pr Collins

Preuve en est l'étude de Sudo *et al.*, 2004, montrant une moindre réponse de l'axe corticotrope face à un stress de contention chez des animaux axéniques (figure ci-dessous) :



Souris colonisées (cercles blancs) et sans flore (GF : Germ-free, cercles noirs).

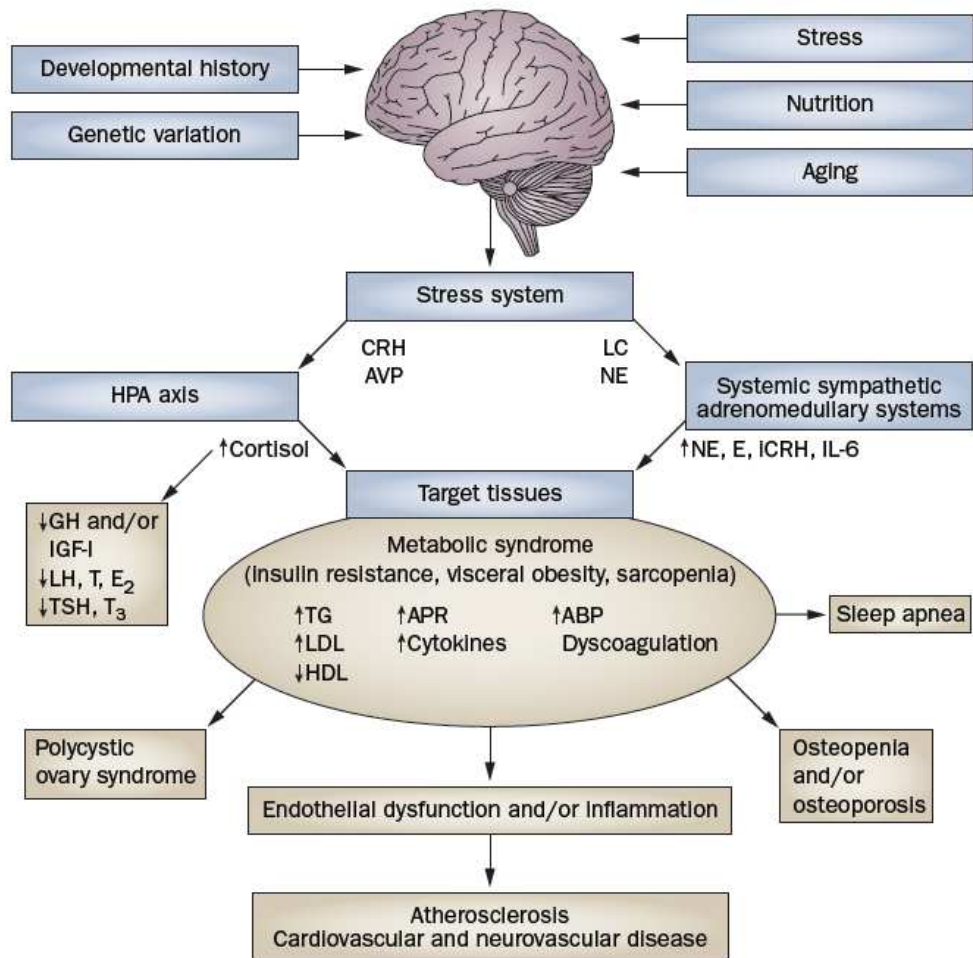


Figure 17 : Implication du stress et des facteurs environnementaux dans les atteintes inflammatoires pouvant conduire à un syndrome métabolique sévère (Chrousos *et al.*, 2009).

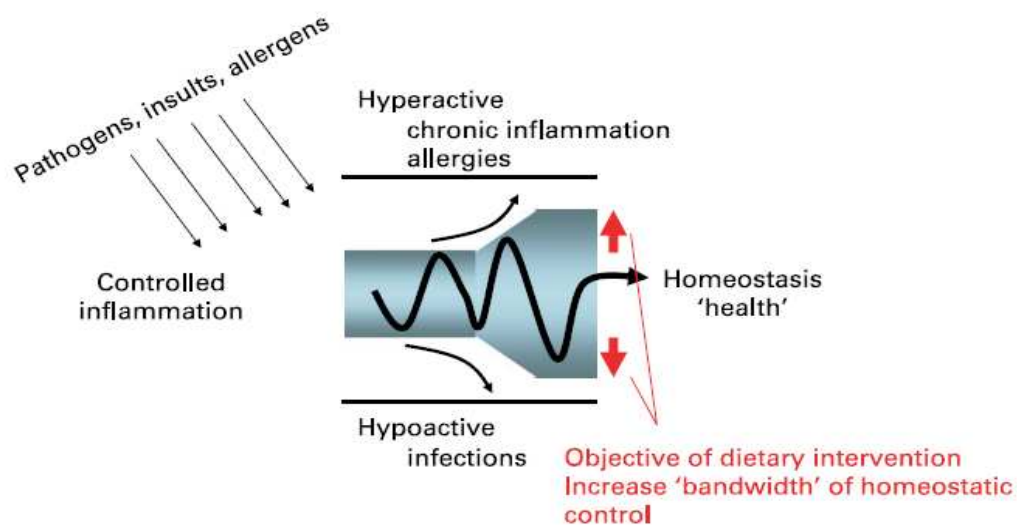


Figure 19 : Processus inflammatoire et intervention nutritionnelle

Ce dernier exemple fait écho à l'ensemble de mon activité de recherche et renvoie à un modèle intégré impliquant le stress, le vieillissement et la nutrition dans la rupture de l'homéostasie, avec pour conséquences de multiples pathologies immunes et métaboliques (figure 17), à prendre en compte dans les contextes inflammatoires du tractus gastro-intestinal. Pour être complet, et introduire mon futur projet de recherche, on peut ajouter aux causes sous-jacentes la contribution de certains polluants environnementaux, évoqués par Calder *et al.*, 2009, groupe d'experts industriels et académiques dans un très récent rapport commissionné par ILSI, Europe sur la nutrition et l'inflammation (figure 18 ci-dessous).

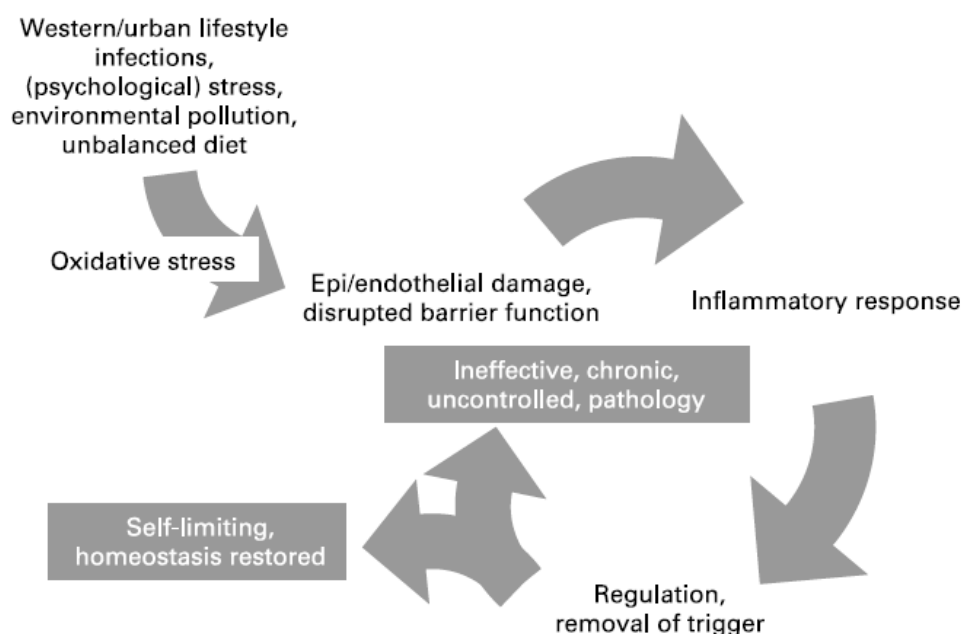


Figure 18 : Différents facteurs associés reliant l'inflammation chronique à un style de vie occidental (pollution, stress psychologique et régime déséquilibré, Calder *et al.*, 2009).

Ce même groupe présente également le concept d'une intervention nutritionnelle « anti-inflammatoire » permettant d'étendre l'amplitude du contrôle homéostatique (figure 19 ci-contre). En renforçant les points de régulation contrôlant l'inflammation, la nutrition peut contribuer à réduire les risques de persistance d'une réponse inflammatoire chronique non contrôlée. De cette façon, la nutrition en général, et d'autres acteurs tels les pré- et probiotiques en particulier, peuvent étendre les possibilités de composer voire de lutter contre l'exposition à des pathogènes, des allergènes, à des toxines et aux altérations tissulaires, en évitant la spirale conduisant à des réponses inflammatoires dégénérées.

Travaux de Thèse.

"Désadaptation au Stress Vieillessement et Homéostasie et trophicité intestinale"

Présentation succincte des principaux travaux et publications réalisés au laboratoire : Groupe de recherche sur la Trophicité et le Vieillessement, Nice (06)

Travaux de Post-Doctorat.

"Biothérapeutiques et Inflammation"

*Sélection des principaux travaux et publications réalisés au laboratoire :
Bactériologie des Ecosystèmes / Bactéries Lactiques et Immunité des muqueuses, IPL :*

- Contribution au programme Européen "DeproHealth"
un travail en réseau
des outils optimisés
- Projet "LcrV"

une collaboration étroite (avec l'unité INSERM U801)
un "détournement" efficace ...
- Rôle des Cellules dendritiques dans la fonctionnalité probiotique
une stratégie originale pour une approche mécanistique

Travaux depuis l'obtention du poste de CR IPL (2007)

Sélection des principaux travaux et publications réalisés au laboratoire

"Biothérapeutiques, Inflammation ... et Infections",

De nouveaux modèles pour d'autres mécanismes

"Biodiversité Probiotique"

De nouveaux candidats

De nouvelles collaborations

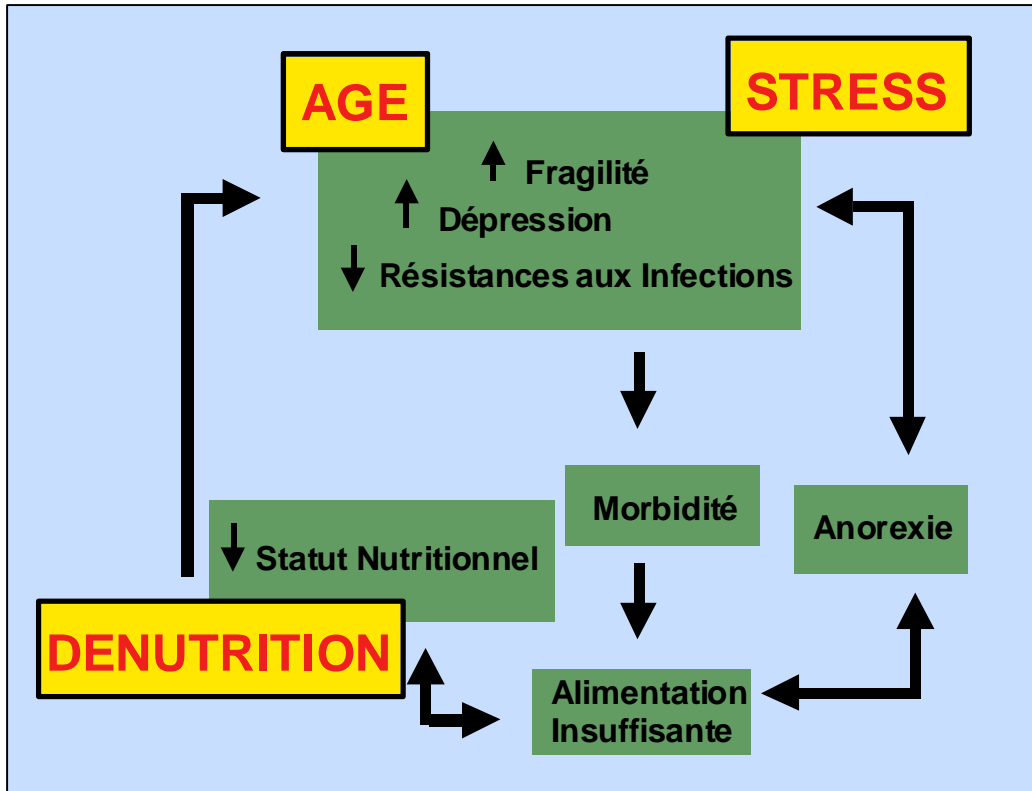


Figure 21 : Le cycle morbide de dénutrition (Payette, 1996) et ses intrications avec le stress et le vieillissement...

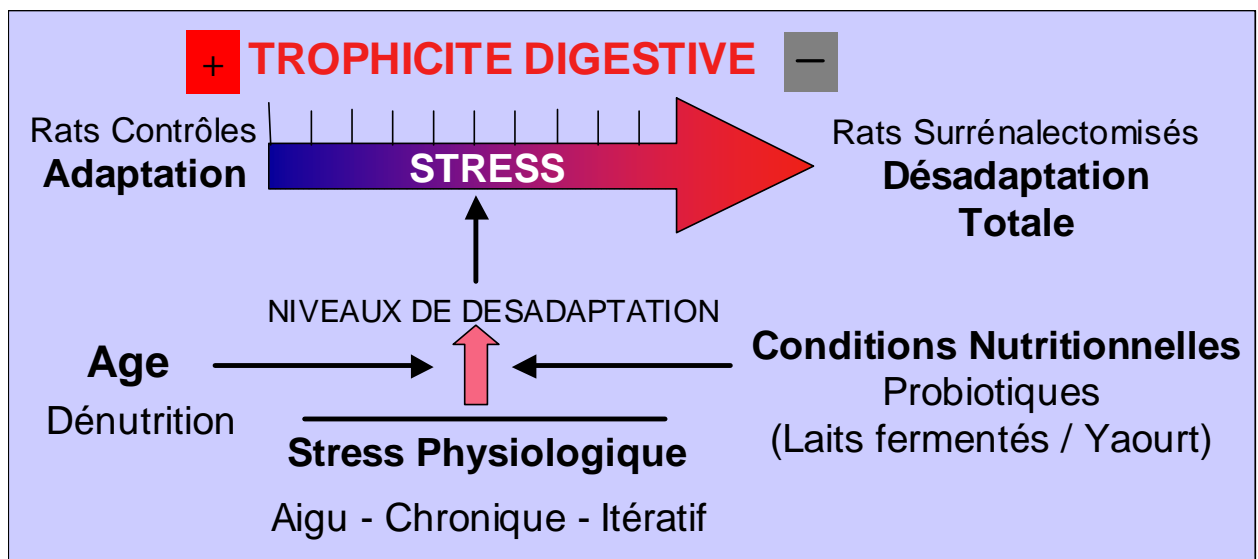


Figure 22 : Trophicité digestive : rôle du stress, de l'âge et des conditions nutritionnelles.

Désadaptation au Stress, Vieillesse, et Fonctionnalité intestinale

Le but de ce travail a été de développer un modèle animal de détresse trophique et digestive, se rapportant à un contexte mêlé de désadaptation au stress et de dénutrition partielle. Ce modèle s'est efforcé de reproduire les conditions similaires aux déficits trophiques observées chez la personne âgée fragilisée et en phase d'épuisement dans la réponse au stress (figures 21 et 22). Le rôle des conditions nutritionnelles étant incontournable, un tel modèle nous a servi à évaluer les effets d'un aliment fonctionnel (régime standard supplémenté en Yaourt) sur les paramètres de trophicité de cette muqueuse intestinale perturbée. Plusieurs études distinctes ont permis d'aborder successivement les conséquences de l'âge et les effets d'une alimentation supplémentée en Yaourt dans un contexte d'atteinte de la trophicité intestinale où le Stress et ses niveaux d'adaptation et de désadaptation sont en étroite relation avec l'âge et les conditions nutritionnelles.

Dans un premier temps, l'étude des effets du Yaourt sur les paramètres trophiques de la muqueuse intestinale chez les rats jeunes (3 mois) et âgés (23 mois) en conditions basales nous a permis de caractériser les paramètres majeurs de trophicité de l'intestin grêle de l'animal jeune et âgé dans des conditions basales. L'accent a été mis sur les différences liées à l'âge et sur les conséquences fonctionnelles résultant du vieillissement de cette muqueuse intestinale. Parallèlement, ces mêmes paramètres ont été étudiés en analysant les effets à moyen terme (20 jours) d'une alimentation isocalorique intégrant 33 % de Yaourt. On retrouve, dans ce volet nutritionnel, une analyse des différences liées à l'âge associées à ce régime, en soulignant les conséquences de cette alimentation supplémentée en lait fermenté sur la trophicité respectives des rats jeunes et âgés.

Une seconde partie a consisté en la mise en place d'un modèle de détresse digestive chez le rat jeune. Nous avons observé les conséquences trophiques d'une désadaptation au stress chez l'animal jeune (rat de 3 mois) par le biais de la surrénalectomie bilatérale à 10 jours. Cette étude nous a renseigné sur les paramètres de l'épithélium intestinal (et leurs sens de variations) sensibles à l'absence de corticoïdes au regard des animaux n'ayant subi aucune agression (rats témoins) et au vécu du seul stress opératoire par laparotomie (rats opérés "à blanc").

Dans un second temps, les conséquences trophiques de la surrénalectomie ont été évaluées chez l'animal âgé (rat de 23 mois). Nous avons précisé la réponse d'une muqueuse intestinale âgée face à la rupture de l'axe corticotrope adaptatif mais aussi face au vécu du seul stress opératoire par l'animal âgé. Parallèlement, l'impact qualitatif d'une alimentation associée à la présence de Yaourt a été étudié sur ces modèles de

stress opératoire et de surrénalectomie chez l'animal âgé. Cela a entre autre permis de préciser que la présence d'un régime en partie enrichi en lait fermenté peut influencer la fonctionnalité de l'épithélium intestinal et dans quelles mesures l'action trophique du Yaourt peut s'exercer sur une muqueuse fragilisée.

Enfin, une analyse transversale du vécu du stress opératoire, de la surrénalectomie et des effets trophiques d'un lait fermenté comme le Yaourt a mis en évidence l'extrême adaptabilité de la muqueuse digestive, ses limites et les processus de compensation qu'elle peut mettre en place.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet de plusieurs publications présentées ci-après :
Article 1, Article 2 et Article 3.

Digestive Diseases and Sciences, Vol. 46, No. 6 (June 2001), pp. 1236–1246

Changes in Cell Proliferation and Differentiation of Adult Rat Small Intestine Epithelium After Adrenalectomy Kinetic, Biochemical, and Morphological Studies

BENOIT FOLIGNE,* SABBAAH AISSAOUI,* FRANCOISE SENEGAS-BALAS, PhD,*
CHANTAL CAYUELA, PhD,† PATRICE BERNARD,* JEAN-MICHEL ANTOINE, PhD, MD,‡ and
DANIEL BALAS, PhD, MD*

Digestive Diseases and Sciences, Vol. 48, No. 6 (June 2003), pp. 1147–1158 (© 2003)

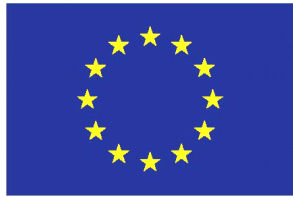
Intestine Trophic Parameters in Aged and Young Rats Evidence of Defective Adaptation by Aging and Lack of Corticoids

BENOIT FOLIGNE, PhD,* FRANCOISE SENEGAS-BALAS, PhD,* RAFFAELE CURSIO, PhD,†
CHANTAL CAYUELA, PhD,‡ JEAN-MICHEL ANTOINE, PhD,‡ NATHALIE ROLF-PETERSEN, PhD,‡
and DANIEL BALAS, PhD, MD*

Digestive Diseases and Sciences, Vol. 49, Nos. 7/8 (August 2004), pp. 1291–1301 (© 2004)

Trophic Status of the Small Intestine in Young and Aged Rats: Modulation by a Yogurt-Supplemented Diet

BENOIT FOLIGNE, PhD,* FRANÇOISE SÉNÉGAS-BALAS, PhD,* JEAN-MICHEL ANTOINE, PhD,†
CHANTAL CAYUELA, PhD,‡ NATHALIE ROLF-PEDERSEN, PhD,† and DANIEL BALAS, PhD, MD*



PROEUHEALTH

Biothérapeutiques et Inflammation

C'est en 2003 que j'ai rejoint le laboratoire « Bactériologie des Écosystèmes » de l'Institut Pasteur de Lille, (dirigé par A. Mercenier 1998-2002 ; puis par Bruno POT, depuis 2002 ; aujourd'hui rebaptisé BLIM depuis 2006), pour effectuer un post-doctorat dans le cadre d'un projet européen. Ce projet : **DEPROHEALTH**, coordonné par le Dr **Annick Mercenier**, faisant lui-même partie du groupe PROEUHEALTH fédérant 64 partenaires de recherche répartis dans 16 pays européens.

Dans quel but?

Financée par l'Union Européenne, l'étude du consortium **PROEUHEALTH** proposait une approche scientifique pour examiner le rôle des bactéries probiotiques sur notre bien-être. L'étude menée au sein du groupe permettant :

- 1) d'accroître nos connaissances sur le rôle des bactéries intestinales sur la santé et les maladies de l'homme et,
- 2) de développer de nouveaux aliments et de nouvelles thérapies fonctionnelles.

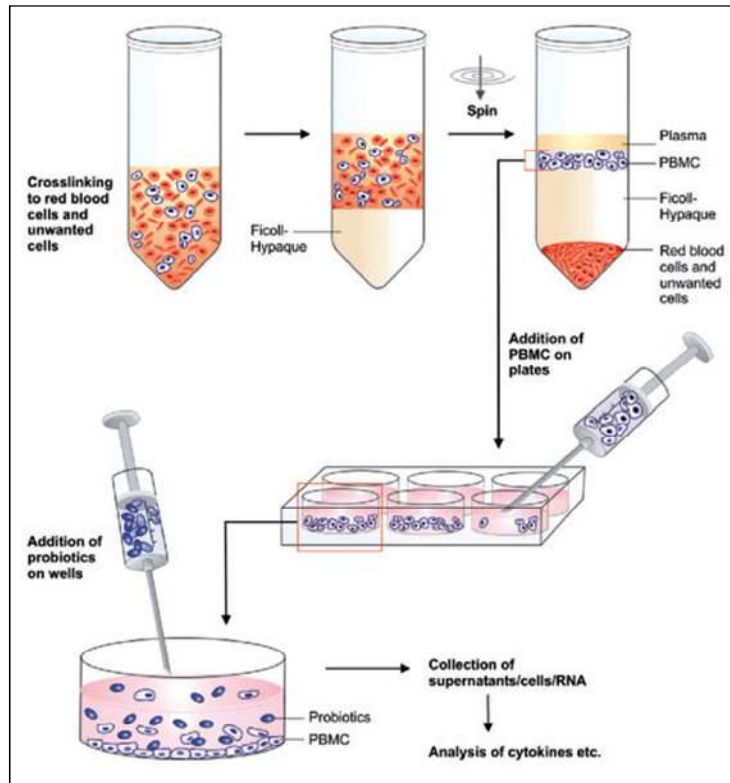
Projet : **DEPROHEALTH** : Les probiotiques de seconde génération

Ce projet a visé à développer de nouvelles souches de probiotiques et à étendre leurs propriétés bénéfiques. Cela est rendu possible par la manipulation de souches spécifiques capables de produire une molécule ayant un effet bénéfique sur notre santé. Ce projet a eu pour cible les maladies liées à *Helicobacter pylori*, bactérie nocive pouvant entraîner des ulcères à l'estomac, ainsi qu'aux rotavirus à l'origine de diarrhées graves, notamment chez l'enfant. L'interaction entre les probiotiques et le système immunitaire humain a également été étudiée, pour tenter d'identifier les mécanismes sous-jacents à cette relation.

Numéro de projet: QLK1-2000-00146 / Coordinateur: Prof. Annick Mercenier.

Le projet étant initié depuis 2 ans lors de mon arrivée, j'ai succédé au **Dr Sophie Nutten** en axant mes travaux sur l'évaluation des propriétés immunomodulatrices des bactéries lactiques. Reprenant les méthodes développées au laboratoire, je me suis efforcé de mettre en évidence les capacités « souches-spécifiques » de ces bactéries *in vitro* et *in vivo*.

La mise en œuvre de modèles murins de colite expérimentale, notamment celui du modèle aigu induit par le TNBS, a aussi bien permis l'évaluation de souches de bactéries sauvages, de mutants et de bactéries de 2^{nde} génération, dans le contexte de ce projet Deprohealth. Au delà du cadre stricte de ce programme européen, ces développements ont également contribué à valoriser d'autres recherches propres au laboratoire (projet LcrV, rôle des cellules dendritiques dans la fonctionnalité probiotique anti-inflammatoire) ainsi que les contrats de recherches industriels durant cette expérience post-doctorale.



D'après R. Kekonnen et al, 2008.

Figure 23: Test d'Immunomodulation *in vitro* via les PBMCs humains

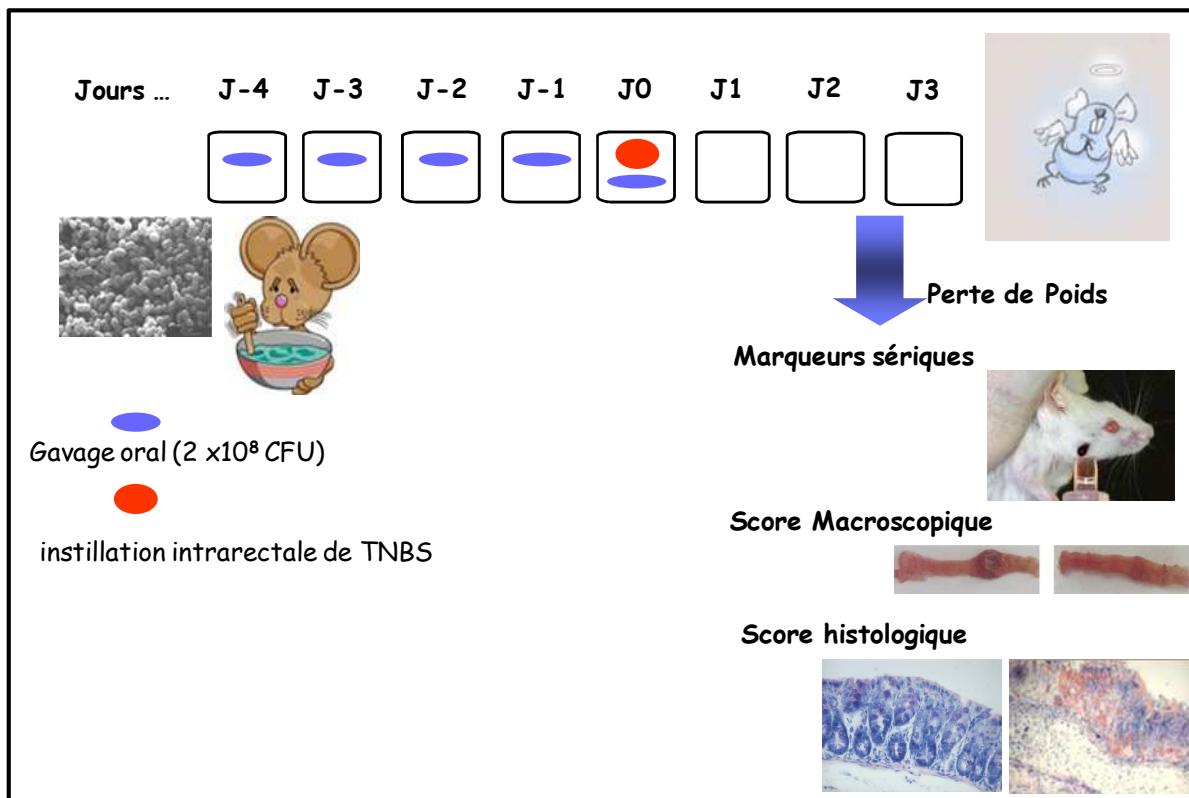


Figure 24 : Le modèle expérimental murin de colite induite au TNBS

Bactéries Lactiques et Immunomodulation

I- Contribution au programme Européen "DeproHealth"

D'un point de vue pratique, ce programme de recherche a consisté en une « sélection » (screening) d'une série de lactobacilles, et à la construction et l'évaluation immunologique d'une collection de souches recombinantes produisant un facteur biologique susceptible de moduler directement ou indirectement une réponse immune. Le génie génétique a permis de souligner l'importance de composants de parois spécifiques dans la capacité d'une souche à interagir avec le système immunitaire de l'hôte (Granette *et al.*, 2005).

L'optimisation du modèle animal d'inflammation intestinale (TNBS), précédemment développé au laboratoire par le Dr **Sonia Pavan** (Pavan *et al.*, 2003) a permis de souligner l'importance de certains paramètres microbiologiques dans la protection induite par une bactérie lactique. Au-delà du modèle proprement dit qui nécessite un cadre précis en terme de dose de l'agent générant la colite, de durée nécessaire à l'établissement de cette inflammation ainsi que des paramètres d'évaluation, nous avons pu monter et confirmé que l'évaluation et la comparaison de la protection potentielle induite par les bactéries lactiques nécessitait notamment de tenir compte de la dose, de la phase de croissance et de la viabilité des bactéries.

Cela a permis une réelle « standardisation » du modèle TNBS appliqué aux bactéries lactiques, travail repris dans l'article 4 publié dans la revue *Digestive Disease and Science*, 2004. Dans cet article, nous montrons également que la souche recombinante de *Lactococcus lactis* sécrétant l'IL-10 murine construite par **Lothar Steidler** (participant du Deprohealth) et protégeant les souris dans une inflammation induite au DSS ainsi que chez des souris déficientes en IL-10 (Steidler *et al.*, Science 2000), est également efficace dans ce troisième modèle.

L'évaluation des profils de cytokines induits après stimulation de cellules périphériques mononucléées de sang humain (PBMCs) ainsi que l'application du modèle d'inflammation intestinal (TNBS), procédures illustrées dans les figures 23 et 24 ci-contre, a mis en évidence une assez bonne corrélation pour les souches naturelles. En particulier, le rapport IL-10/IL-12 s'est révélé être un index de choix parmi les critères de sélection de souches à fort potentiel anti-inflammatoire *in vivo*. Ce constat présenté à l'issue du projet Deprohealth (Mercenier *et al.*, 2004) a ensuite été étendu à d'autres souches et a fait l'objet d'une publication présentée ci après, Article 5, *World J of Gastroenterology*, 2007. L'utilisation du ratio IL-10/IL-12 comme marqueur de sélection a été éprouvée depuis pour d'autres bactéries à coloration Gram positive.

Digestive Diseases and Sciences, Vol. 51, No. 2 (February 2006), pp. 390–400 (© 2006)
DOI: 10.1007/s10620-006-3143-x

Recommendations for Improved Use of the Murine TNBS-Induced Colitis Model in Evaluating Anti-inflammatory Properties of Lactic Acid Bacteria: Technical and Microbiological Aspects

BENOIT FOLIGNÉ, PhD,* SOPHIE NUTTEN, PhD,* LOTHAR STEIDLER, PhD,† VÉRONIQUE DENNIN,* DENISE GOUDERCOURT,* ANNICK MERCENIER, PhD,* and BRUNO POT, PhD*

PO Box 2345, Beijing 100023, China
www.wjgnet.com
wjg@wjgnet.com



World J Gastroenterol 2007 January 14; 13(2): 236-243
World Journal of Gastroenterology ISSN 1007-9327
© 2007 The WJG Press. All rights reserved.

BASIC RESEARCH

Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria

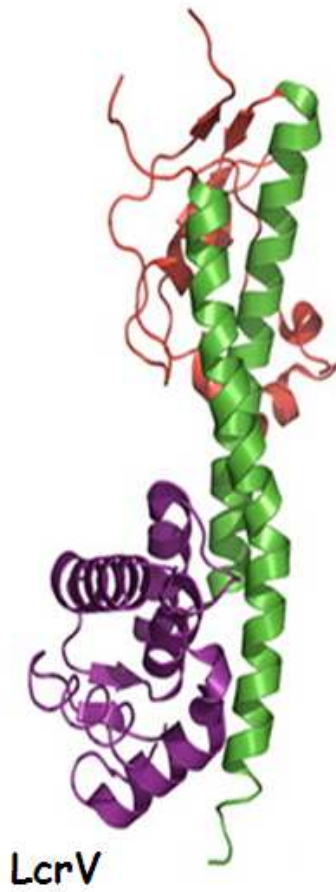
Benoit Foligne, Sophie Nutten, Corinne Granette, Véronique Dennin, Denise Goudercourt, Sabine Poiret, Joelle Dewulf, Dominique Brassart, Annick Mercenier, Bruno Pot

Foligne B, Nutten S, Granette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, Dewulf J, Brassart D, Mercenier A, Pot B. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 2007; 13(2): 236-243

© 2007 The WJG Press. All rights reserved.

Key words: Inflammatory bowel disease; Probiotics; Cytokines; Peripheral blood mononuclear cells; Trinitrobenzene sulfonate-induced colitis

<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/236.asp>



LcrV

Figure 25 : Représentation schématique de l'architecture de la protéine Low calcium responsive V antigen LcrV de *Yersinia*

II- Projet "LcrV"

Prévention et Traitement de Colites avec la souche *Lactococcus lactis* sécrétrice de la protéine LcrV de *Yersinia*

Dans ce projet « collaboratif » avec l'équipe voisine du Pr Michel Simonet (Unité Inserm U801), nous avons repris la stratégie développée par Lothar Steidler et coll. utilisant des bactéries lactiques recombinantes (génétiquement modifiées) afin de délivrer des molécules d'intérêt *in situ*, directement dans l'intestin et plus particulièrement dans le colon. Ces travaux ont montré qu'une vectorisation d'interleukine-10 par cette approche permet d'atténuer l'inflammation dans plusieurs modèles murins de colites (Steidler *et al.*, 2000). Plus récemment, d'autres types de molécules, à visée « trophique », ont aussi amélioré une colite expérimentale (Vandenbroucke *et al.*, 2004). Cette stratégie a d'ailleurs conduit avec succès à une étude clinique ouverte chez l'homme où l'IL-10 apportée par cette voie diminue les effets secondaires des traitements conventionnels en améliorant nettement les dommages chez des patients atteints de la maladie de Crohn (Braat *et al.*, 2006).

Les bactéries lactiques au sens large, incluant les bactéries probiotiques ou «bénéfiques pour la santé de l'hôte» peuvent donc être génétiquement modifiées pour délivrer des molécules anti-inflammatoires directement dans le tube digestif pour le traitement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

En effet, les bactéries lactiques (LAB), maintenant bien connues pour leurs propriétés bénéfiques, sont consommées quasi-quotidiennement depuis des millénaires et utilisées dans le traitement de l'intolérance au lactose, la prévention ou le traitement des désordres intestinaux comme les diarrhées, le traitement de certaines formes d'allergie ou maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), incluant la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, représentent un problème majeur de santé publique. Bien que l'étiologie exacte de ces maladies reste encore inconnue, ce type de pathologie semble être associé à des réponses immunes anormales et à une perte de tolérance vis à vis de la flore endogène. La plupart des stratégies thérapeutiques utilisées actuellement ciblent la suppression ou la modulation des mécanismes inflammatoires de l'hôte. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques est nécessaire pour pallier les effets secondaires associés aux traitements conventionnels, à l'absence de réponse de certains patients et aux rechutes fréquentes. En raison de l'importance de la flore intestinale dans le développement des MICI, manipuler ce composant offre une approche thérapeutique nouvelle fascinante. Pour permettre une immuno-intervention plus active chez les patients, des bactéries lactiques de seconde génération à meilleur

potentiel curatif doivent être conçus à l'aide d'outils d'ingénierie génétique (Wells et Mercenier, 2008).

Depuis déjà plusieurs années, le Laboratoire "Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses", s'intéresse aux propriétés anti-inflammatoires de certaines bactéries lactiques dans le contexte des maladies inflammatoires de l'intestin. Le laboratoire, sous l'impulsion initiée par le Dr Annick Mercenier, s'intéresse également au développement et à l'utilisation de ces bactéries pour délivrer des molécules vaccinales et thérapeutiques aux muqueuses et plus particulièrement dans le tractus digestif. L'équipe animée par le Dr **Catherine Daniel** a réussi à modifier génétiquement la souche bactérienne alimentaire non pathogène *Lactococcus lactis* en lui faisant sécréter la protéine LcrV de la bactérie entéropathogène *Yersinia pseudotuberculosis*. Cette protéine (Low-calcium V responsive antigen), (figure 25), joue un rôle primordial dans l'échappement de la bactérie au système immunitaire de l'hôte en stimulant la synthèse de l'interleukine anti-inflammatoire IL-10 et en inhibant l'activation de cytokines pro-inflammatoires (Tumor necrosis factor TNF alpha et interféron IFN gamma). Nous avons également construit une souche *L. lactis* qui sécrète l'IL-10 murine pour comparer les effets protecteurs de cette souche avec la souche *L. lactis* qui produit LcrV.

Pour réaliser cette étude, nous avons testé l'action bénéfique de la souche *Lc. lactis* productrice de LcrV dans deux modèles murins de colite aiguë expérimentale: l'un induit par le trinitrobenzène acide sulfonique [TNBS] et l'autre par le dextran sulfate de sodium [DSS]. Nous avons ainsi démontré que l'administration orale de la souche *L. lactis* modifiée est capable d'induire *in vivo* la production de LcrV de *Y. pseudotuberculosis* dans le tractus digestif des souris et celle-ci stimule alors la production d'IL-10 dans le côlon et réduit l'inflammation intestinale expérimentale induite par le TNBS. Des effets protecteurs similaires ont été observés après administration orale de la souche *L. lactis* qui produit l'IL-10 mais par contre, la souche *L. lactis* contrôle, qui ne produit pas LcrV, ne possède pas de propriétés anti-inflammatoires intrinsèques et ainsi ne protège pas les souris contre une colite. De plus, la diminution de la réponse inflammatoire de l'hôte (à savoir des marqueurs inflammatoires du côlon et des marqueurs inflammatoires sériques) est bien corrélée avec la réduction des dommages de la muqueuse du côlon des souris prétraitées avec *L. lactis* sécrétant LcrV. Au contraire, la colite induite par le TNBS n'est pas réprimée chez les souris knock-out IL-10 (-/-) (dont le gène codant l'IL-10 a été inactivé) prétraitées par la souche *L. lactis* sécrétrice de LcrV, démontrant que l'IL-10 est nécessaire pour la protection médiée par LcrV. L'administration de la souche *L. lactis* sécrétrice de LcrV s'avère être également très efficace dans la prévention et le traitement de colites aiguës induites par le DSS. Ces travaux ont permis de conclure que la souche *Lc. lactis* sécrétrice de LcrV réduit l'inflammation intestinale induite expérimentalement dans deux modèles murins. Cette nouvelle approche met ainsi en évidence le potentiel de l'utilisation *in vivo* de molécules immunomodulatrices provenant de micro-organismes pathogènes comme nouveaux médicaments thérapeutiques dans les

maladies inflammatoires de l'intestin, reprenant ainsi le concept présenté par Sleator et Hill, 2006 : « Pathobiothechnology : Using bad Bugs to do good things ... ».

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans une collaboration très étroite, tant sur le plan humain et scientifique, avec l'Unité INSERM U801 du **Professeur Michel Simonet**. Cette collaboration, toujours coordonnée par **Catherine Daniel**, se poursuit par l'utilisation de bactéries lactiques génétiquement modifiées produisant la molécule anti-inflammatoire LcrV ou d'autres molécules potentiellement anti-inflammatoires de *Yersinia* pour des applications dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires avant de pouvoir évaluer les effets bénéfiques de ces bactéries dans des études cliniques chez l'homme. Ces travaux vont consister à identifier la région spécifique «anti-inflammatoire» de la protéine LcrV, à construire une souche qui restera confinée dans l'intestin humain sans dissémination dans l'environnement, et à faire sécréter les molécules d'intérêt par une autre bactérie lactique qui possède une activité anti-inflammatoire intrinsèque (comme une souche de lactobacille par exemple).

L'essentiel de ce travail a fait l'objet d'une publication présentée ci-après.

Article 6, *Gastroenterology* 2007

GASTROENTEROLOGY 2007;133:862-874

BASIC-ALIMENTARY TRACT

Prevention and Treatment of Colitis With *Lactococcus lactis* Secreting the Immunomodulatory *Yersinia* LcrV Protein

BASIC-
ALIMENTARY TRACT

BENOIT FOLIGNE,^{**‡} RODRIGUE DESSEIN,[‡] MICHAEL MARCEAU,[‡] SABINE POIRET,^{*} MATHIAS CHAMAILLARD,[§]
BRUNO POT,^{*} MICHEL SIMONET,[‡] and CATHERINE DANIEL^{*}

^{*}Laboratoire des Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses, Institut Pasteur de Lille, Lille; [‡]INSERM Unité 801-Université de Lille II-Institut Pasteur de Lille, Lille; and [§]INSERM Unité 795, Lille, France

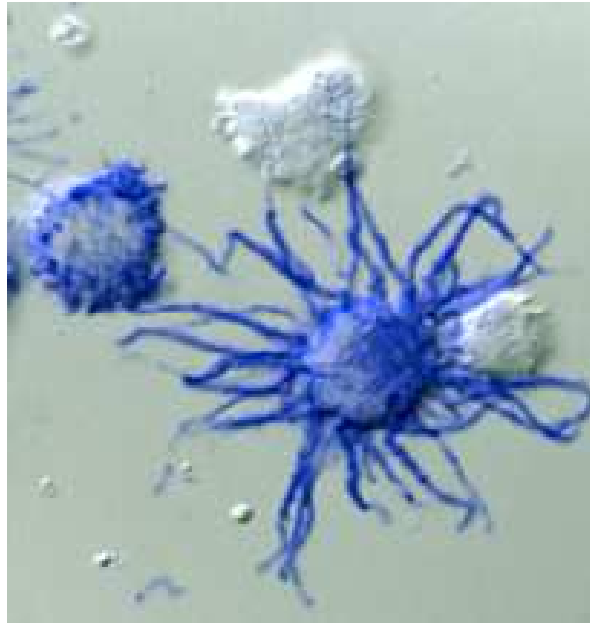


Figure 26 : Micrographie confocale d'une cellule dendritique mature dérivée *in vitro*, provenant d'un progéniteur sanguin CD11c (marquage bleu / HLA-DR). Image: Cécile M. Chalouni, laboratoire d' I. Mellman, en collaboration avec Jean Davoust, Génomique, Evry, France.

III- Fonctionnalité probiotique : rôle potentiel des cellules dendritiques

De nombreuses études thérapeutiques conduites chez l'animal et complétées par des essais cliniques chez l'homme suscitent un espoir dans le traitement de certaines maladies digestives. Un effort considérable reste à faire concernant la mise en évidence des mécanismes précis par lesquels les probiotiques exercent leurs effets bénéfiques. Le Laboratoire de Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses (BLIM), porte un intérêt particulier au pouvoir immunomodulateur des bactéries lactiques en santé humaine et en particulier dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les MICI, représentées principalement par la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn, semblent résulter d'une réponse immunitaire inadaptée vis-à-vis d'éléments de la lumière intestinale. En effet, ces pathologies sont en partie associées à des réponses immunes anormales du tube digestif vis-à-vis de composants de la lumière intestinale et en particulier de la flore chez des sujets génétiquement prédisposés.

L'équipe BLIM a déjà montré que certaines souches de bactéries lactiques (LAB), sont capables de présenter des capacités anti-inflammatoires *in vivo* en étroite corrélation avec leurs propriétés immunomodulatrices *in vitro* (Foligné *et al.*, 2007). D'autres données ont également suggéré que des mécanismes, distants de la zone inflammatoire, pourraient impliquer la migration de populations cellulaires régulatrices. Le groupe mené par le Dr **Corinne Grangette**, du laboratoire, s'intéresse plus particulièrement aux mécanismes impliqués et en particulier au rôle des cellules dendritiques, cellules clés dans la régulation des réponses immunes et de la tolérance. Dans cette étude, avec notamment le concours de **M^{elle} Georgia Zoumpopoulou**, (étudiante en thèse/bourse Marie-Curie), nous avons pu montrer que certaines souches de lactobacilles, mais pas toutes, peuvent induire des cellules dendritiques (DCs) tolérogènes, (figure 26). Le transfert de telles DCs «conditionnées» par des probiotiques a permis de protéger très significativement des souris dans un modèle murin de colite induite par l'acide 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonique (TNBS). Cette protection semble être associée à une réduction de marqueurs inflammatoires et de l'expression de gènes pro-inflammatoires, alors qu'une surexpression locale de l'enzyme immuno- régulatrice indolamine 2, 3 dioxygénase (IDO) est observée. Cette enzyme, produite par des DCs tolérogènes, a la capacité d'exercer des effets immunosuppresseurs sur les cellules T par épuisement du tryptophane, ce qui suggère cette voie de régulation comme un des mécanismes potentiels des capacités immuno-régulatrices des probiotiques. L'effet préventif des DCs traitées par les probiotiques non seulement met en jeu la voie de signalisation dépendante de MyD88, de TLR2 et de NOD2 mais semble impliquer l'induction de cellules régulatrices CD4⁺ CD25⁺ de façon IL-10 indépendante. En somme, ces résultats suggèrent que certains probiotiques peuvent stimuler les fonctions régulatrices des cellules dendritiques en ciblant des voies

de signalisation impliquant des récepteurs spécifiques capables de reconnaître certains motifs bactériens. Les résultats soulignent non seulement le rôle de DCs dans des interactions des probiotiques avec le système immunitaire mais indiquent également leur rôle potentiel dans la thérapie immune de patients atteints de MICI. Ces travaux se poursuivent actuellement et font l'objet d'une thèse (M^{elle} **Elise Macho-Fernandez**), d'une part en continuant la caractérisation des autres populations cellulaires impliquées, mais surtout en essayant d'identifier les composants actifs. L'équipe ayant déjà mis en avant le rôle crucial des composants de paroi dans les capacités pro versus anti-inflammatoires des lactobacilles (Grangette *et al.*, 2005), un accent particulier est maintenant mis sur le rôle de tels facteurs, notamment du peptidoglycane, et l'identification des voies de signalisation impliquées.

Article 7, *PlosOne* 2007

OPEN  ACCESS Freely available online

 PLOS one

A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality

Benoit Foligne^{1,2}, Georgia Zoumpopoulou¹, Joelle Dewulf¹, Amena Ben Younes³, Fabrice Chareyre⁴, Jean-Claude Sirard², Bruno Pot¹, Corinne Grangette^{1*}

1 Laboratoire de Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses, Institut Pasteur de Lille - Institut de Biologie de Lille, Lille, France, 2 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)U801, Institut Pasteur de Lille - Institut de Biologie de Lille, Lille, France, 3 IFR142, Institut Pasteur de Lille - Institut de Biologie de Lille, Lille, France, 4 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U674, Fondation Jean Dausset/CEPH, Paris, France

Citation: Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, et al (2007) A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality. PLoS ONE 2(3): e313. doi:10.1371/journal.pone.0000313

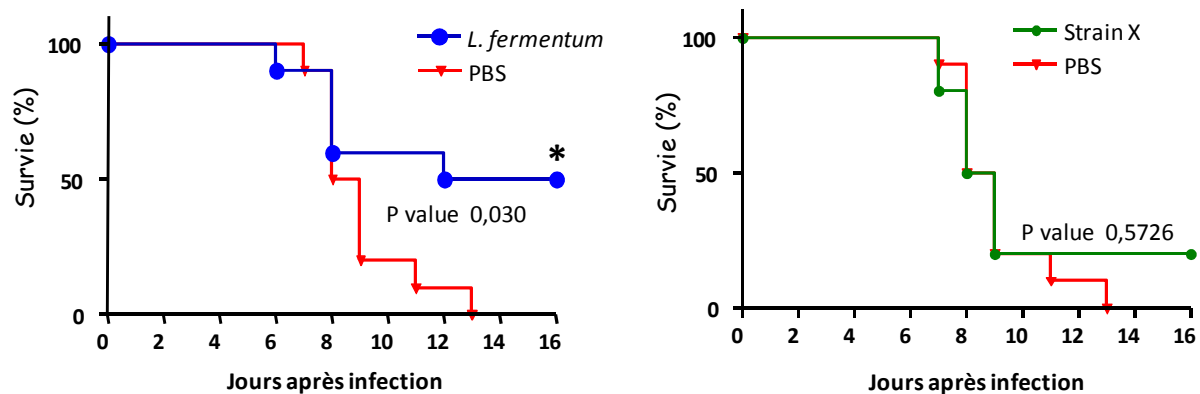


Figure 27: Exemple de courbes de survies différentielles établies pour 2 bactéries lactiques distinctes délivrées préventivement durant 5 jours ($5 \cdot 10^8$ cfu) avant une infection par *S. typhimurium* (Strain C5, 10^6 cfu).

L'utilisation de géloses « ASAP », milieux chromogéniques spécifiques des Salmonelles, permet une excellente Discrimination des autres types de bactéries gram - (i.e. *E. coli* ...) lors des numérations fécales

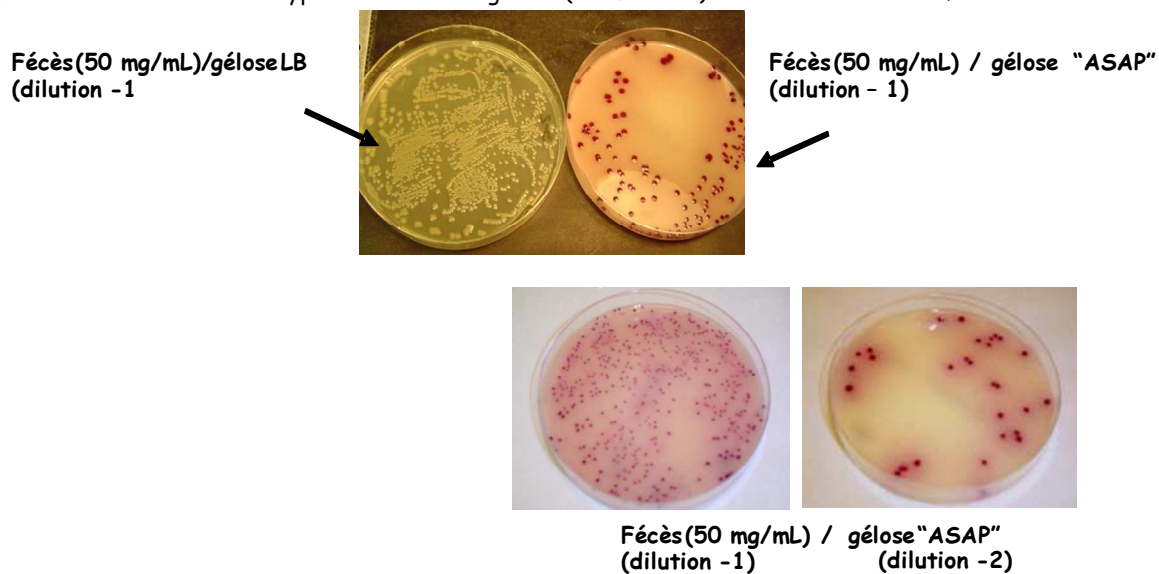


Figure 28: Outils microbiologiques permettant le suivi de la présence de salmonelles dans les fèces de souris infectées.

Biothérapeutiques, Inflammation ... et Infections

I- Biothérapeutiques, Inflammation ... et Infections

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de modulation des réponses immunes intestinales par les probiotiques, il est essentiel de s'assurer des effets des bactéries lactiques et des candidats probiotiques dans d'autres modèles de pathologie intestinale, en particulier dans des contextes infectieux.

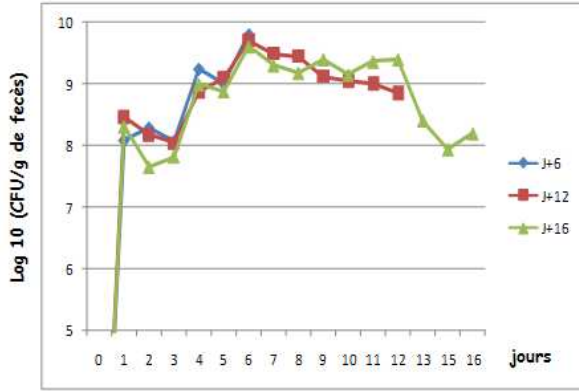
Sachant d'une part qu'un environnement anti-inflammatoire est susceptible de favoriser une infection quand, d'un autre côté, certaines bactéries entéropathogènes induisent généralement une inflammation associée de la muqueuse intestinale, la question des critères de sélection d'un candidat probiotique capable de contenir une infection est primordiale.

Au-delà des effets directs de compétition nutritive et de sécrétion de molécules antimicrobiennes, qu'elles soient d'origine bactérienne ou induites par l'hôte, identifiées ponctuellement pour certaines souches de bactéries lactiques, peu d'études ont comparé les potentialités anti-infectieuses des bactéries lactiques sous l'angle de leur pouvoir immuno-modulateur ou immunostimulant. Cette approche implique la caractérisation d'un grand nombre de souches diverses et variées dans des modèles animaux éprouvés et reproductibles.

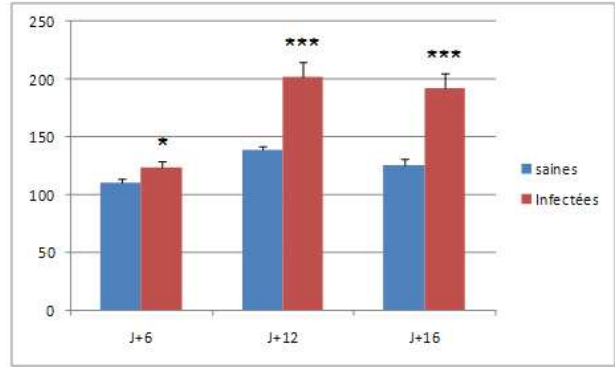
Dans un premier temps, nous avons développé un modèle murin d'infection orale par l'agent *Salmonella typhimurium*. La pathologie associée chez le rongeur s'apparente à une fièvre typhoïde dont l'issue est une septicémie fatale liée au côté entéro-invasif du pathogène. Il repose principalement sur l'établissement de courbes de survie (Un exemple est présenté à la [figure 27](#) ci-contre), accompagné du suivi fécal de la présence et du nombre de pathogènes ([figure 28](#)). Des numérations dans les organes permettent aussi de monitorer la translocation des salmonelles. Ce modèle permet donc l'évaluation des conditions limitant le développement du pathogène dans le tractus digestif ainsi que le franchissement de la barrière intestinale. Si le développement de ce cadre expérimental a permis d'identifier certaines souches performantes (Zoumpoulou *et al.*, 2007), aucune corrélation n'a cependant pu être mise en évidence entre les profils de cytokines induits *in vitro* (PBMCs) et l'efficacité des bactéries lactiques ou encore de levures alimentaires. Ce résultat est toutefois limité par le nombre encore trop restreint d'évaluations à ce jour et les investigations se poursuivent.

De la même façon, aucune corrélation, positive ou négative, n'a pu être établie entre la performance de souches dans le modèle TNBS et la protection contre *S. typhimurium*; ici encore, notre base de données demande à être étoffée et on ne peut pas conclure à l'usage préférentiel d'un probiotique à profil plutôt pro- ou anti-inflammatoire.

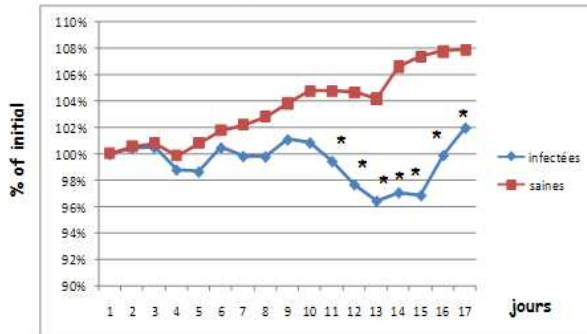
A : Evolution de *Citrobacter* dans les fécès de souris infectées



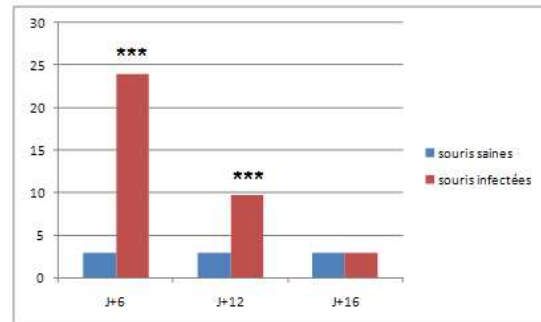
C: Evolution du poids des rates (mg) après infection



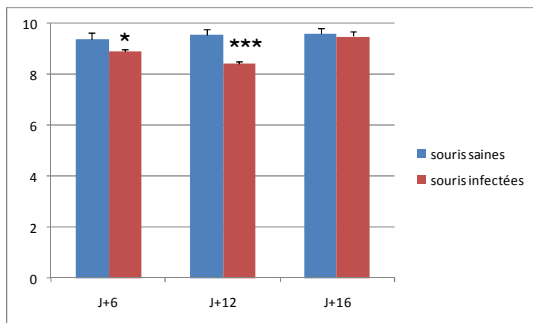
B : Evolution du poids des animaux après infection



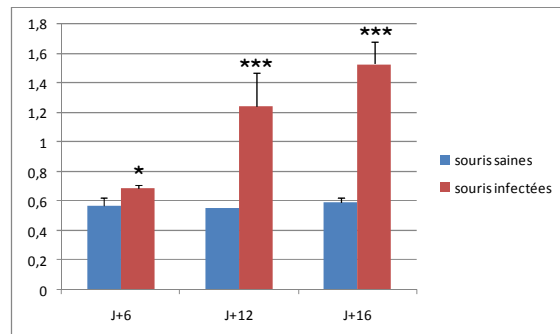
D: Evolution de la SAA sérique ($\mu\text{g/ml}$) après infection



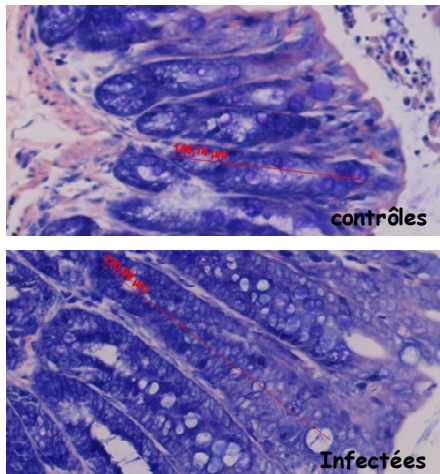
E: Evolution de la longueur du colon (cm)



F: Evolution de la Myéloperoxydase (MPO)



G: Hyperplasie des cryptes



H: Déplétion des cellules muqueuses

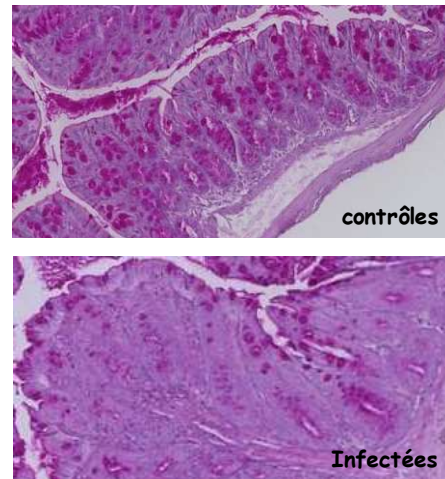


Figure 29.

En complément, je me suis plus récemment intéressé à un contexte de colite infectieuse, cherchant à disposer d'un contexte mêlé de réponse anti-microbienne et d'inflammation mucoale.

L'établissement d'une inflammation modérée induite par un agent pathogène est en effet un contexte particulièrement intéressant pour poursuivre nos investigations. Nous avons retenu l'agent *Citrobacter rodentium* qui s'apparente, chez la souris, aux infections par *Escherichia coli* entéroinvasives et entérohémorragiques. Par ailleurs, les lésions hyperplasiques du colon associées ont également rapproché ce modèle des contextes de maladies inflammatoires de l'intestin (IBD) et de cancers coliques (Borenshtein *et al.*, 2007).

Ce modèle et d'autres apparentés ont déjà permis de mettre en évidence des effets protecteurs préventifs ou thérapeutiques de différents probiotiques (Chen *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2008) mais, encore une fois, ceux-ci n'ont jamais établi de liens avec d'autres modèles inflammatoires (TNBS, DSS) et infectieux (Salmonelles).

Délibérément, le choix d'une espèce de souris relativement « résistante » (Balb/c), s'est imposé pour permettre de satisfaire un contexte réaliste, physiologique et éthique. Les premiers résultats utilisant des bactéries et des levures sont très encourageants (figure 29 ci-contre) et « alimentent » déjà notre base de données commune aux modèles TNBS et Salmonelle, également développée chez cette même espèce de souris.

Légende de la Figure 29: Sélection des principaux paramètres traduisant l'impact d'une infection par *C. rodentium* chez des souris Balb/c. A : Accumulation et persistance du pathogène 16 jours après infection. B : Suivi de la masse corporelle des animaux contrôles et infectés. C : Evolution du poids des rates des animaux, traduisant une splénomégalie après infection. D : Variation du taux sérique de Serum Amyloid A protéine. E : Evolution de la longueur du colon montrant un net raccourcissement, caractéristique de l'inflammation. F : Evolution de l'activité MPO du colon traduisant l'infiltration neutrophilaire associée à l'infection. G : Hyperplasie des cryptes observée 12 jours après infection. H : Déplétion des cellules muqueuses, observée 12 jours après infection.

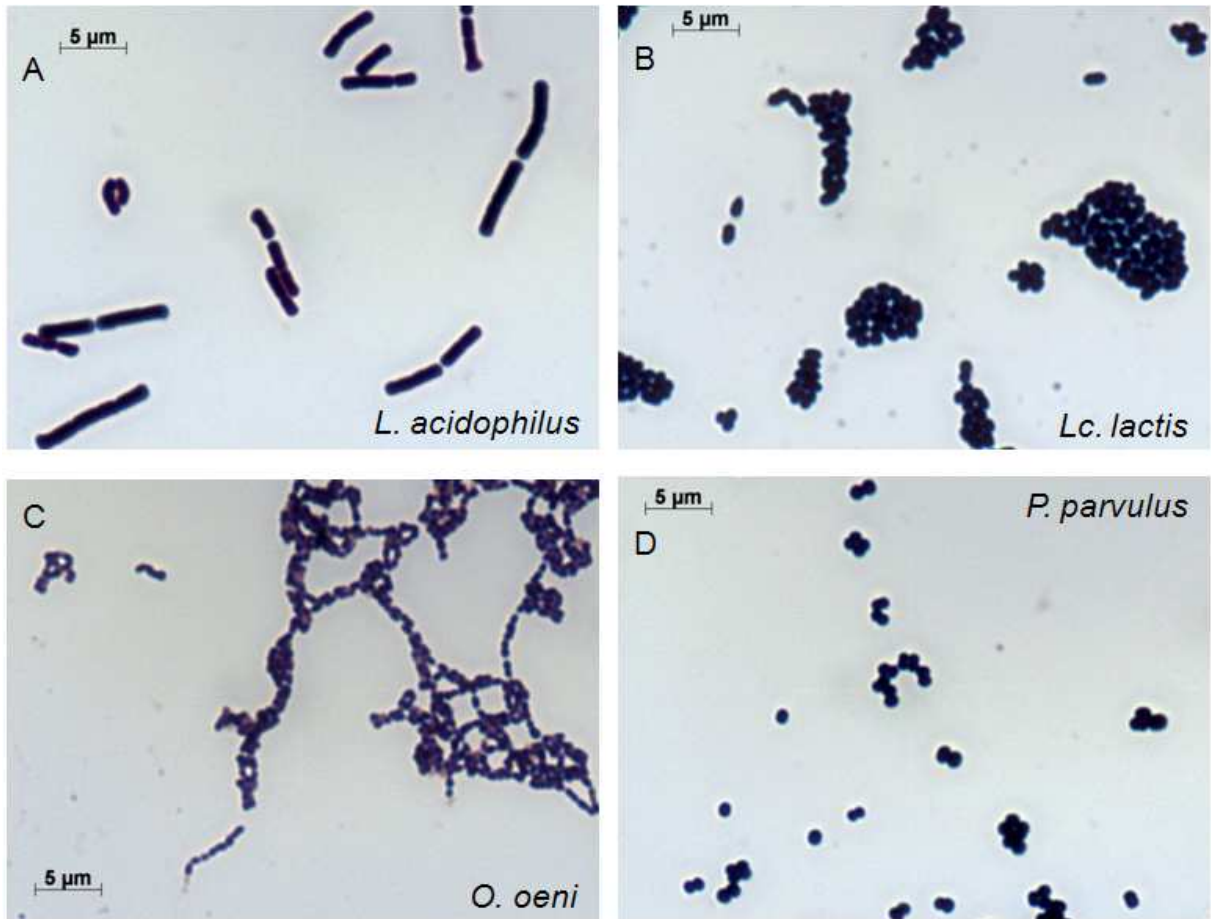


Figure 30 :

Représentation de la diversité morphologique des quelques bactéries lactiques ; A : *Lactobacillus acidophilus*, B : *Lactococcus lactis*, C : *Oenococcus oeni* et D : *Pediococcus parvulus*. (Colorations et photographies réalisées au laboratoire).

II- Projet "Biodiversité Probiotique"

L'exploration de l'expression de la biodiversité bactérienne dans les activités anti-inflammatoires des probiotiques est parmi les projets qui me tiennent particulièrement à cœur. En effet, au-delà de la compréhension des « effets » souche-spécifiques, il est possible de déterminer des traits propres à chaque genre et espèce bactérienne et d'essayer de les lier à des structures, orientations métaboliques ou physiologiques particulières. Cette démarche est dynamique et implique l'étude d'un grand nombre de souches *in vitro*. Elle a été rendue possible par l'amélioration des méthodes développées, notamment le test PBMCs (défini précédemment) :

L'utilisation des contrôles internes, à l'aide d'un set de 5 souches bien caractérisées et couvrant la gamme d'induction des différentes cytokines, a permis de réduire considérablement les variations de réponses entre les différents donneurs de PBMCs ;

La calibration des suspensions bactériennes, en équivalence de turbidimétrie, en lieu et place des CFU, a permis de s'affranchir de la diversité des formes, de l'aggrégabilité des bactéries entre elles et de différentes organisations (bactéries isolées ou chaînes plus ou moins longues ...) dont un exemple est montré [figure 30](#).

A la lumière de ces méthodes de screening, associées ou non aux investigations *in vivo*, nous avons pu mettre en évidence une grande diversité de réponses immunes selon les souches.

On peut citer ici, en partenariat avec Nestlé, l'identification de très bons candidats anti-inflammatoires dont la performance *in vivo* a été confirmée de façon approfondie jusqu'à un stade que l'on peut qualifier de pré-clinique, et faisant l'objet d'une publication.

Par-contre, la disparité des réponses *in vivo* des différentes levures d'origine alimentaire dans un modèle de colite aiguë induite au TNBS (certaines souches très efficaces, d'autres intermédiaires ou sans effet), a permis de mettre en évidence une absence de corrélation avec l'index IL-10/IL-12 pour ces organismes unicellulaires eucaryotes. Ce travail, en partenariat avec la société Lesaffre, est également soumis à publication.

Plus récemment, nous avons abordé la diversité des réponses générées par les bactéries du groupe des Propionibactéries, à l'initiative et en étroite collaboration avec le laboratoire STLO, de l'INRA de Rennes ; la thématique est plus que prometteuse et fait l'objet de développements approfondis. Mon attachement à la région Bretagne, à la ville de Rennes et à ses habitants ne fait qu'accroître ma motivation à poursuivre cet axe.

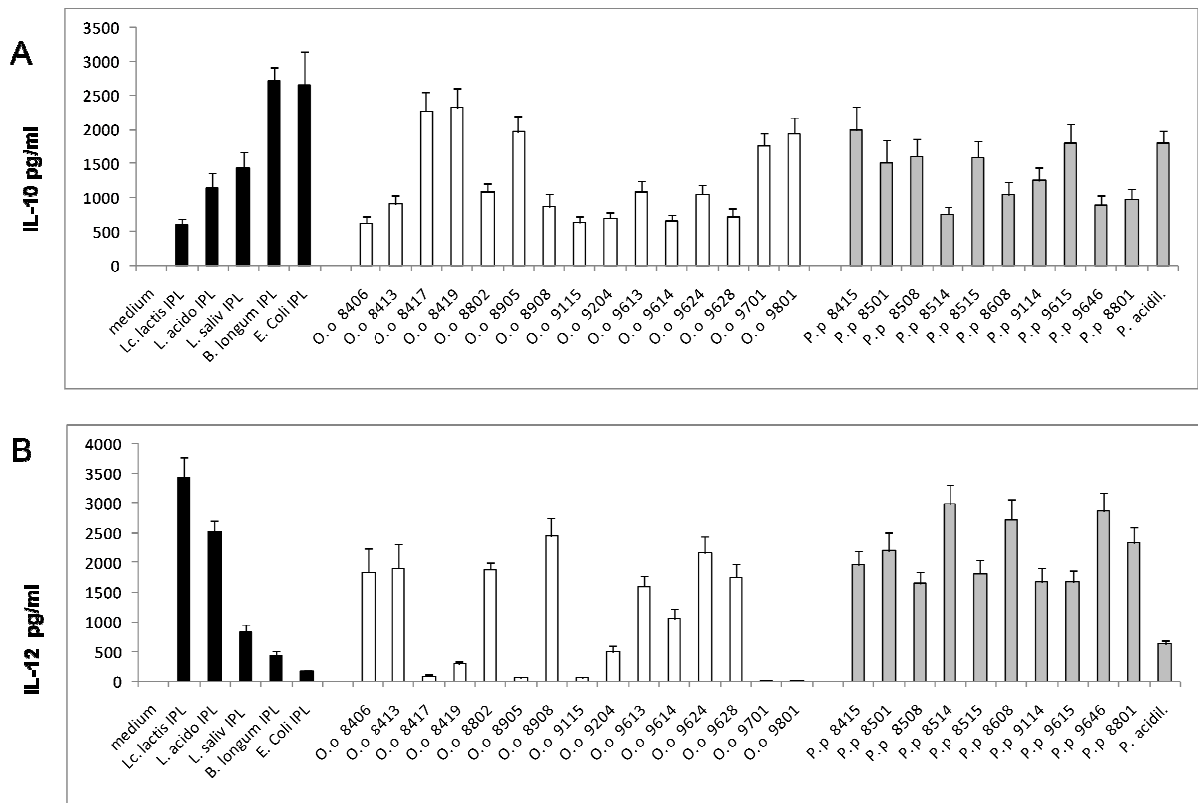


Figure 31 :

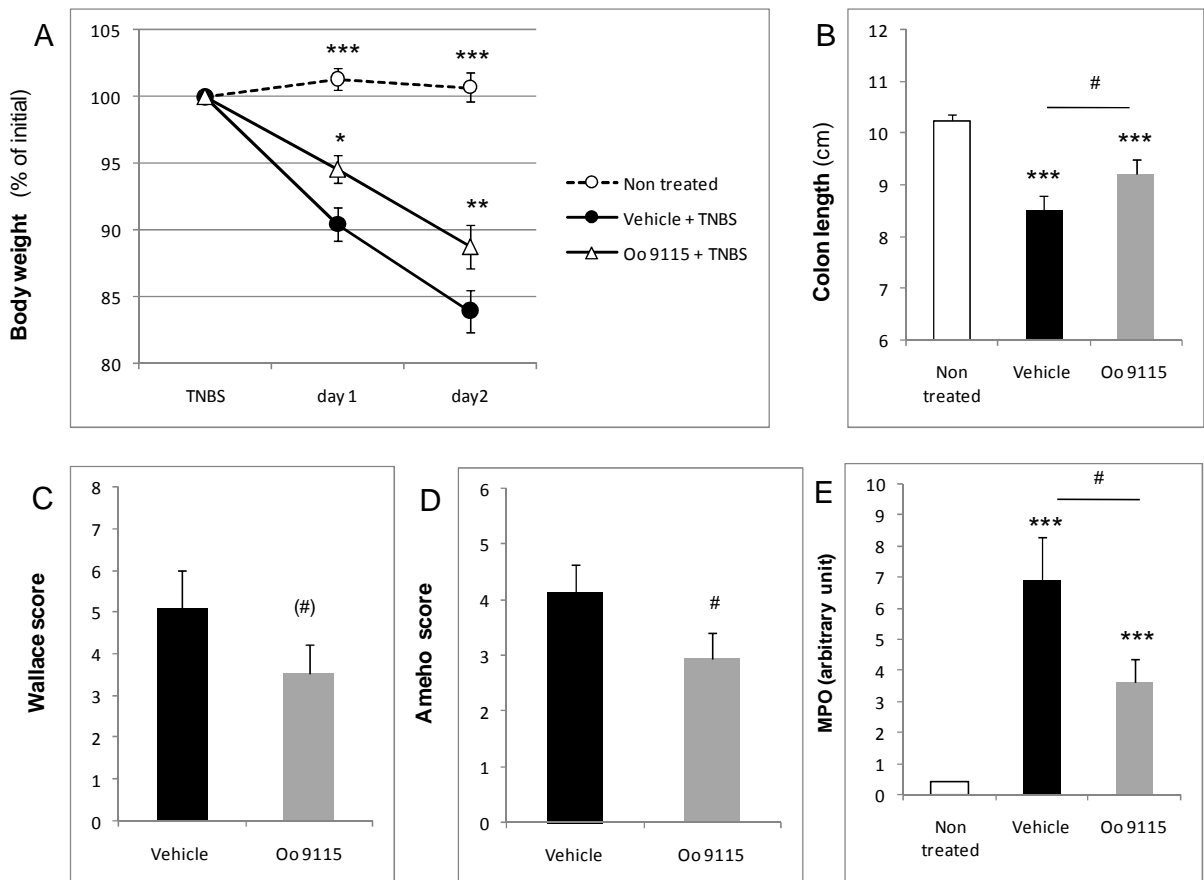


Figure 32 :

Enfin, je souhaite mentionner un travail moins attendu mais qui me tient particulièrement à cœur, concernant l'immunomodulation induite par certaines souches de bactéries lactiques œnologiques. C'est lors d'un congrès, à l'occasion d'une rencontre fortuite avec les membres d'un laboratoire rattaché à l'Université de Bordeaux, que la question des potentialités probiotiques de souches moins conventionnelles de bactéries lactiques s'est posée.

En effet, la plupart des bactéries « probiotiques » appartiennent au genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et, dans la plupart des cas, ont été isolées du tractus gastro-intestinal humain. Toutefois, d'autres bactéries lactiques moins conventionnelles ont des caractéristiques structurelles et fonctionnelles similaires et pourraient conférer des bénéfices sur la santé de l'hôte dans la mesure où elles sont ingérées en quantités suffisantes et que l'innocuité de ces souches après consommation est avérée.

Nous avons exploré les activités immuno-modulatrices/stimulantes *in vitro* de 25 souches de bactéries lactiques appartenant aux espèces *Oenococcus oeni* (n=15) et *Pediococcus parvulus* (n=10). Alors que les cytokines libérées par PBMC's après stimulation par des souches de *P. parvulus* sont peu discriminantes, nous avons obtenu des profils de cytokines induites très « dépendants des souches » pour *O. oeni* (figure 31). L'innocuité *in vivo* de 3 souches d'*O. oeni* administrées par voie orale à forte dose (3×10^9 CFU/jour durant 7 jours consécutifs) ayant été confirmée, nous avons évalué la capacité d'une de ces souches à prévenir une colite expérimentale aiguë induite au TNBS. Bien que la performance de protection n'atteigne pas les niveaux obtenus via des souches de lactobacilles et de bifidobactéries probiotiques, un effet anti-inflammatoire *in vivo* a toutefois pu être mis en évidence pour une souche d'*O. oeni* (25 à 30 % de réduction des paramètres inflammatoires, figure 32). Un manuscrit détaillant ce travail est actuellement soumis à publication dans *Applied Environmental Microbiology*.

Figure 31 : Profils de sécrétion des cytokines IL-10 (A°) et IL-12 (B) par des PBMCs humains (4 donneurs) induits après stimulation par diverses bactéries lactiques d'origine œnologique (*O. oeni* et *P. parvulus*).

Figure 32 : Principaux paramètres caractérisant la protection de *O. oeni* IOEB 9115 dans un modèle murin de colite aiguë au TNBS. A : perte de poids, B : longueur du colon, C : score macroscopique, D : score histologique, E : activité myéloperoxydase, traduisant l'infiltrat tissulaire des neutrophiles.



Figure 33 :

Publicité du début du siècle vantant les mérites du vin, citant **Louis Pasteur** :
 « Le Vin est la plus saine et la plus hygiénique des Boissons ».

La très bonne tolérance de ce type de bactéries vis-à-vis de l'acidité, de l'alcool, de la présence de composés soufrés et phénoliques et d'une manière générale, vis-à-vis de conditions extrêmes, souligne d'autant plus l'utilisation possible de souches de *O. æni* sélectionnées comme probiotiques potentiels.

Au delà de l'anecdote caractérisant pour la première fois des effets anti-inflammatoires *in vivo* de souches microbiologiques associées aux premières étapes de l'élaboration du vin (fermentation malo-lactique), des études croisées et comparatives sur le « surfacéome », le « métabolome » et le « sécrétome » de telles bactéries avec d'autres bactéries probiotiques plus usuelles pourront faciliter la compréhension des mécanismes et le développement de nouveaux agents thérapeutiques (structure des parois, capacité à sécréter des exopolysaccharides de différents types).

Très récemment, d'autres équipes se sont intéressé et ont exploré les potentialités de ce genre de souches allochtones moins conventionnelles comme *Pediococcus parvulus*, (dePalencia *et al.*, 2009), *Leuconostoc citreum* (Kang *et al.*, 2009), allant toutefois rarement jusqu'à la caractérisation des effets *in vivo* (Masuda *et al.*, 2008), avec par exemple des bactéries du genre *Tetragenococcus halophilus*.

Evidemment, la quantité résiduelle de bactéries contenue dans une bouteille de vin, (fusse-t-elle d'un grand millésime ...), est nulle ou trop faible pour exercer un quelconque effet probiotique direct. Par conséquent, le potentiel probiotique de ces souches doit s'envisager en dehors de leur habitat naturel et à forte concentration en tant que supplément alimentaire ; le vin pouvant être un véhicule intéressant pour délivrer ces souches. Cette dernière possibilité n'est pas sans rappeler la promotion bénéfique du vin pour la santé, clamée en son temps pas Louis Pasteur (figure 33).

Les applications potentielles de ces bactéries ne sont pas restreintes au traitement de l'inflammation et leur fonctionnalité peut également s'envisager pour d'autres applications probiotiques anti-infectieuses ou encore de détoxification.

Pour ma part, je crois fortement en l'utilisation potentielle de bactéries ou de molécules dérivées de bactéries « extrémophiles », à faible croissance et/ou à croissance lente, recelant, dans leur diversité, des spécificités pouvant influencer le système immunitaire. Comme pour les « adaptogènes » végétaux, on ne peut en effet exclure l'existence de nombreux « principes actifs » d'origine bactérienne. On pourrait même s'aventurer à évaluer des bactéries lactiques flagellées (Ishikawa *et al.*, 2009) voire des organismes issus du domaine des Archaea ...

Projets de Recherche 2010-2013



Prospective Probiotique, Mécanismes et Biodiversité.

Il s'agira de poursuivre l'identification et la caractérisation de microorganismes pour leurs propriétés probiotiques dans les divers contextes infectieux et inflammatoires ;

La comparaison des effets de diverses souches dans un même modèle et d'un même microorganisme dans différents contextes pathologiques, permettra de préciser et de compléter la compréhension des mécanismes impliqués, tant du côté de l'hôte que du point de vue microbiologique. L'utilisation de bactéries mutantes ainsi que d'animaux invalidés ou sur-exprimant une fonction particulière sera ponctuellement envisagée.

Le screening de microorganismes « moins conventionnels » et l'évaluation des potentialités de ces souches pourront également s'avérer intéressant pour exclure ou confirmer des mécanismes supposés.

Ces travaux permettront de poursuivre et d'entretenir les liens privilégiés établis avec l'industrie pour une valorisation mutuelle des informations.

Cette perspective reprenant les activités développées précédemment ne sera pas détaillée dans cette section.



Projet "Mélodie-Rêve".

Ce projet fédératif s'intéresse à l'impact des xénobiotiques, notamment de métaux lourds tels les sels de plomb (Pb) et de cadmium (Cd), sur les réponses immunes et inflammatoires induites au niveau de l'Ecosystème intestinal. Une composante essentielle de ce projet envisage également la possibilité de manipuler la flore afin de prévenir mais aussi de limiter les effets délétères de ces contaminants.

Outre l'intérêt scientifique évident dans le contexte régional et local actuel, ce projet multidisciplinaire implique 3 partenaires de l'Institut Pasteur de Lille, fédérant ainsi des activités fondamentales, appliquées et d'expertises au sein de l'Institut.

Ce projet fera l'objet de mon activité principale les 3 prochaines années et va permettre entre autres, le recrutement d'un Ingénieur d'Etude ainsi que d'un Post-doctorant. Délibérément, j'ai choisi de le présenter dans la forme brute selon laquelle il a été soumis, dans le respect des recommandations de l'Agence Nationale de la Recherche, à savoir « rédigé » en anglais et sous le format prédéfini par l'Agence.

Celui-ci est présenté à la page suivante.



Stress périnatal & Fonctionnalité intestinale

Enfin, ce dernier volet est une participation collaborative qui me permet de renouer avec les notions de Stress et de programmation/désadaptation autour de l'axe « Cerveau-Intestin »....

Le contenu de cet axe est introduit et présenté brièvement.

I- Projet "Mélodie-Rêve" :

Métaux Lourds, Désordres Immunitaires, Ecotoxicologie Intestinale & Remédiation *in vivo*.

Le projet "Mélodie-Reve" se compose de deux axes complémentaires où "Mélodie" s'entend pour "Métaux lourds, désordres immunitaires et écotoxicologie intestinale" et "Reve" pour "(bio)-Remédiation *in vivo*". La proposition objective les aspects écotoxicologiques de l'exposition orale aux sels de métaux lourds (ML) sur l'écosystème intestinal, en ciblant particulièrement le rôle central de la flore dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Nous pensons en effet que les altérations de l'écosystème digestif, consécutives à une exposition chronique aux ML, influencent fortement l'immunité des muqueuses en induisant et/ou favorisant les affections gastro-intestinales latentes et préexistantes au-delà de l'impact bien connu des ML sur l'immunité et la balance oxydative.

Nous envisageons dans un premier temps de caractériser chez la souris l'influence d'une exposition orale et chronique à de faibles doses de sels de ML (plomb et cadmium, distinctement) en conditions basales ainsi que dans des situations pathologiques telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et des infections d'origines intestinales. En plus d'établir le rôle pro- ou anti-inflammatoire des ML et leur impact sur les réponses immunes intestinales (facteurs de risques), une attention particulière étudiera les effets de ces xénobiotiques sur la flore (dysbiose). La contribution de la flore dans la dissémination de ces composés toxiques au sein de l'organisme et de leurs effets sera également abordée.

Le but ultime est de proposer une approche préventive et thérapeutique pour contrer les effets délétères de ces contaminants métalliques, basée sur la manipulation du microbiote intestinal. En effet, l'utilisation de bactéries lactiques et de levures naturelles sélectionnées peut non seulement limiter les risques d'entrée et de persistance des ML au niveau du tractus digestif (bioremédiation), mais ces microorganismes alimentaires peuvent aussi en réduire les effets (action probiotique, en fonction de leurs propriétés intrinsèques anti-inflammatoires, anti-oxydantes et anti-génotoxiques). A cette stratégie s'ajoute l'application novatrice du génie génétique permettant l'expression de protéines de surfaces recombinantes hétérologues (telles les métallothionéines) afin d'accroître la biosorption bactérienne, l'immobilisation et la clairance des ML.

En conclusion, ce projet interdisciplinaire utilise donc à la fois des modèles *in vitro* et animaux de pathologies digestives, en intégrant des champs d'expertise en toxicologie, microbiologie, et immunologie afin d'évaluer l'impact des ML sur l'immunité et l'écophysiologie intestinale. Le recours à une stratégie biothérapeutique et à l'utilisation d'outils innovants sont aussi d'un intérêt majeur pour traiter la toxicité directe et indirecte des ML et envisager des bénéfices cliniques et économiques évidents.

*P*rogrammation ANR 2009 "Contaminants-Ecosystèmes-Santé"



Programme transversal

Biologie - santé

Ecosystèmes & Développement Durable

■ Contaminants, Ecosystèmes, Santé

Programmation 2009 :

Projet : **MELODIE-REVE**

(Document-projet : 65 pages non restitué ici ...)

II- Stress périnatal, Développement & Fonctionnalité intestinale

En collaboration avec Le Pr Didier VIEAU, Fabien DELAHAYE (doctorant),

Dénutritions maternelles périnatales, Université Sciences & Technologies de Lille 1, France.

Relation mère/lactation/absorption intestinale chez le rat nouveau-né issu de mère dénutrie.

Bien que ce projet repose essentiellement sur les travaux initiés et développés dans le groupe du **Pr D. Vieau** (USTL, Lille 1) je tenais à mentionner cet axe de recherche collaboratif qui s'inscrit parfaitement dans mes préoccupations premières, à savoir les interactions entre les notions de stress/désadaptation aux stress et la fonctionnalité intestinale. En effet, l'impact d'un stress, qu'il soit d'origine nutritionnel (dénutrition), toxique (alcool, xénobiotiques), physique (contention) ou encore psychologique est évident sur la fonctionnalité intestinale (perméabilité, trophicité, ...) et sur l'homéostasie de l'Ecosystème digestif au sens large. En retour, les perturbations de cet écosystème vont fragiliser l'organisme, activant les dysfonctionnements immunitaires, métaboliques et endocriniens (l'axe corticotrope, neuropeptides intervenant dans la prise alimentaire, ...).

Contexte

Des données épidémiologiques chez l'homme et expérimentales chez l'animal ont récemment montré que des stress périnataux, tels que la dénutrition maternelle, ont non seulement des conséquences immédiates sur le développement du fœtus/nouveau-né mais aussi sur la programmation de pathologies chroniques de l'adulte. Ces stress vont être à la base d'un retard de croissance intra utérin qui se caractérise par un petit poids de naissance. Le lien entre petit poids de naissance et susceptibilité accrue au développement de pathologies telles que l'hypertension, le diabète de type 2 et l'obésité (regroupées sous le terme de syndrome métabolique) découle d'observations réalisées à partir d'individus nés pendant la famine d'Amsterdam en 1945. Sur la base de ces observations, David Barker a proposé en 1993 que la sous-nutrition maternelle serait responsable d'une « programmation fœtale » de pathologies métaboliques chez les descendants à l'âge adulte (Barker *et al.*, 1993). Le syndrome métabolique, qui représente la première cause de mortalité en France avec environ 200 000 décès par an, pourrait donc, dans certains cas, avoir une origine neuro-développementale. Depuis, « l'hypothèse de Barker » a été étendue à d'autres types de stress périnataux (stress maternel par contention, diabète gestationnel, hypoxie du fœtus, exposition du fœtus à l'alcool...) et il semble clair dorénavant que d'autres pathologies telles que la dépression, l'ischémie ou encore certaines formes de schizophrénie, voire même la Maladie d'Alzheimer pourraient être la conséquence d'altérations subies pendant la période périnatale.

Entre la naissance et la troisième semaine de vie, il a été montré, chez la souris, que des hormones périphériques comme la leptine (synthétisée essentiellement par le tissu adipeux blanc), l'insuline (produite par les cellules β pancréatiques) et les glucocorticoïdes (fabriqués par le cortex surrénalien) qui jouent des rôles cruciaux dans les régulations métaboliques présentent des variations importantes de leurs taux plasmatiques (Ahima *et al.*, 1998). Il est intéressant de constater que ces hormones périphériques jouent un rôle clé dans le contrôle des régulations métaboliques chez l'adulte et qu'elles ont pour cible privilégiée les neurones orexigènes et anorexigènes du noyau arqué (pour revue voir Arora *et al.*, 2006). Des travaux réalisés à partir de souris ob/ob, qui ne produisent pas de leptine et développent un syndrome métabolique à l'âge adulte, ont démasqué un rôle inattendu et crucial de la leptine dans la mise en place des connexions des noyaux hypothalamiques impliqués dans le métabolisme énergétique (Bouret *et al.*, 2004). En revanche, un apport de leptine exogène entre le 2^{ème} et le 18^{ème} jour post-natal (au moment du pic endogène observé chez les animaux contrôles) rétablit, chez le jeune animal et chez l'adulte, une densité de l'innervation provenant du noyau arqué comparable à celle observée chez les animaux contrôles. Au contraire, des injections de leptine exogène en dehors de cette période critique sont sans effet.

Pour tester l'hypothèse de Barker, plusieurs équipes ont mis au point différents modèles expérimentaux chez l'animal, mimant une dénutrition maternelle pré-, post- ou périnatale. En utilisant un modèle de dénutrition maternelle prénatale consistant en une réduction de l'apport calorique global de 70% (animaux FR30) pendant toute la gestation, il a été montré que les rats présentent à l'âge adulte non seulement des traits de syndrome métabolique (Vickers *et al.*, 2000, Rivière *et al.*, 2005) mais qu'ils grossissent plus que des animaux témoins en présence d'un régime riche en graisses délivré à partir du sevrage (Vickers *et al.*, 2000). D'autres études, menées à partir des rats FR30, ont montré que ces animaux issus de mères dénutries développent des altérations métaboliques associant une hyperinsulinémie, une hyperleptinémie, une obésité sévère, une hyperphagie (Vickers *et al.*, 2000) et des anomalies des connexions hypothalamiques des neurones à POMC ainsi que des modifications de différents paramètres hormonaux en réponse au jeûne (Breton *et al.*, 2009). Chez ces mêmes animaux, un traitement par des injections de leptine chez le nouveau-né prévient la plupart des altérations métaboliques observées chez l'adulte (Vickers *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que les taux plasmatiques de leptine doivent être altérés, chez les nouveau-nés issus de mères dénutries et qu'un traitement précoce par la leptine pourrait « déprogrammer » le syndrome métabolique des FR30 adultes.

Récemment, en utilisant un modèle de dénutrition maternelle périnatale de 50% pendant la dernière semaine de gestation et toute la lactation (qui recouvre la période pendant laquelle intervient le pic post-natal de leptine, FR50), l'équipe de D. Vieau a

démontré que les ratons nouveau-nés issus des mères FR50 présentent des pics plasmatiques de leptine considérablement amoindris pendant les deux premières semaines de vie ainsi que des anomalies des connexions hypothalamiques des neurones à POMC (Delahaye *et al.*, 2008).

La leptine outre son rôle de régulateur de la prise alimentaire et son action précoce dans la mise en place des connexions hypothalamiques impliquées dans la programmation de l'appétit, possède également des récepteurs présents dans différents tissus périphériques. A ce titre, elle pourrait exercer des rôles importants dans la différenciation et la mise en place de différents organes (tissu adipeux blanc et brun, poumons, surrénales, intestin et muscle squelettique) jouant un rôle important dans les régulations métaboliques.

Parmi les questions soulevées,

Quels sont les causes de la chute drastique des taux plasmatiques de leptine chez le raton FR50 nouveau-né ?

Cette chute des niveaux circulants de leptine chez le raton a-t-elle des conséquences morpho-fonctionnelles sur le développement d'organes et/ou tissus exprimant la forme longue du récepteur de la leptine ?

Une restauration par des injections post-natales de leptine exogène peut-elle « déprogrammer » les altérations observées ?

L'adoption des nouveau-nés FR50 par des mères « contrôles » peut-elle prévenir les altérations observées chez les FR50 ? (mise en évidence d'un possible effet lactation)

Implication dans le projet

Les points concernant l'origine de la leptine et les conséquences sur le développement d'organes seront abordés sous l'angle intestinal ;

La diminution des taux plasmatiques de leptine observée chez les FR50 pendant les 2 premières semaines de vie pourrait avoir de multiples origines, d'ailleurs non exclusives. Elle pourrait être consécutive à une diminution de la quantité de leptine chez la mère FR50 dans la mesure où la dénutrition de 50% entraîne une non-prise de poids des femelles dénutries pendant la gestation. De plus, il a été montré que la leptine présente dans le sang maternel peut être retrouvée dans le lait, puis dans le plasma du nouveau-né indiquant que des altérations des taux de leptine de la mère sont susceptibles de modifier les concentrations de leptine chez le raton (Casabiell *et al.*, 1997). Par ailleurs, pour pouvoir se retrouver dans le sang du nouveau-né, la leptine doit traverser le tube digestif, en particulier au niveau du petit intestin où sont présents les différentes formes de récepteurs de la leptine. A cet égard, il a été montré récemment que la leptine présente dans l'intestin facilite le transport de dipeptides, l'activité

intestinale et donc l'efficacité de lactation qui est amoindrie chez les FR50 (Hindlet *et al.*, 2009 ; pour revue Guilmeau *et al.*, 2004). Ainsi, une déficience en leptine dans la lumière intestinale pourrait avoir des conséquences sur le développement et le fonctionnement du petit intestin. Enfin, il est possible également, qu'une partie du pic post-natal de leptine soit due à une diminution de la masse de tissu adipeux blanc et/ou de l'expression de la leptine par ce tissu chez les nouveau-nés FR50. De fait, des résultats préliminaires indiquent que l'expression de leptine est amoindrie chez les FR50 âgés de 21 jours. Selon toute vraisemblance, la diminution plasmatique des taux de leptine observée pourrait être la résultante de ces différents phénomènes.

Il s'agira de mettre en œuvre les analyses morphologiques et fonctionnelles d'investigation de l'intestin d'animaux FR50 et témoins âgés de 21 jours, issus- ou non d'adoptions croisées, avec apport- ou non de leptine exogène :

- Etudes histologiques permettant de mesurer notamment la taille des villosités, et immunohistochimiques (marqueurs fonctionnels).
- Expression génique par qRT-PCR de marqueurs sensibles à l'action de la leptine comme PepT1, marqueur de différenciation intestinale, enzymes digestives.
- Perméabilité du compartiment intestinale : suivi sérique de marqueurs fluorescents de différentes tailles (dextran-FITC) délivrés *in vivo* oralement, chambres de Ussing.

Ce projet vise donc à étudier les effets éventuels de la leptine et/ou de la lactation sur ces mises en place ce qui n'a jamais été réalisé à ce jour. L'étude pourrait constituer une étape importante afin d'essayer d'authentifier la leptine comme un « biopeptide » potentiel pour prévenir le développement de pathologies d'origine développementale d'une part, et d'évaluer l'importance de la lactation en tant que facteur de programmation/déprogrammation.

La meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la programmation périnatale de pathologies chroniques de l'adulte (obésité, hypertension, et diabète de type 2 en particulier) est aujourd'hui essentielle afin de proposer à l'avenir des traitements plus efficaces.

Favoriser la restitution de la trophicité et la fonctionnalité intestinale, via des pré- et des probiotiques appropriés, pourrait ainsi influencer la programmation neuronale,

L'utilisation de Bactéries lactiques recombinantes afin de délivrer de la leptine *in situ*, qui a déjà été envisagée dans d'autres applications (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2007) est également une perspective séduisante et prometteuse dans le compartiment intestinal et muqueux, comme cela a été montré pour d'autres protéines (Wells et Mercenier, 2008).

Conclusions et Remarques

Conclusions et Remarques ...

D'une manière générale, le fil conducteur de mon parcours scientifique est donc bien l'homéostasie intestinale et la modélisation de ses perturbations sous de multiples aspects. Au-delà de la caractérisation de certaines réponses adaptatives à ces différentes agressions, une constance dans mes travaux est également la recherche d'éléments préventifs ou thérapeutiques susceptibles de limiter voire de traiter ces manifestations délétères.

Les premières approches ont intéressé des formes de stress « généraux » (perturbation de l'axe corticotrope) par le jeûne et la surrénalectomie, associées à une désadaptation trophique et un déficit nutritionnel. Des interventions alimentaires, notamment un régime supplémenté en Yaourt, ont pu montrer une action bénéfique de laits fermentés dans de tels contextes, toutefois limités aux aspects « trophiques » et « fonctionnels ». J'y ai appris à considérer l'extrême plasticité du tractus digestif ainsi que la délicatesse et les « limites » de mise en œuvre des modèles animaux qui, une fois contrôlés et optimisés, sont ô combien plus réalistes et les seuls à représenter un contexte général.

Des conditions pathologiques plus ciblées sur le tractus digestif ont ensuite été adressées, notamment en modélisant des atteintes inflammatoires et infectieuses mimant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Ceci m'a permis de prendre en compte toute la dimension « immunitaire » du tractus digestif ainsi que le rôle « central » du microbiote. Les possibilités d'intervention ont toujours été très présentes, notamment par la manipulation de cette flore et l'évaluation de microorganismes probiotiques. Sans préjuger des nombreux mécanismes mis en jeu, un point crucial est avant tout, à mon sens, la caractérisation des « effets biologiques » d'une molécule ou d'un organisme. Cet effort sera poursuivi en s'appuyant sur la sélection et les caractéristiques des candidats performants et de souches « modèles » déjà obtenues pour « alimenter » à l'avenir une recherche plus fondamentale et répondre à des questions précises.

Ces expériences m'ont permis de développer un certain esprit critique quant à la manipulation des bactéries lactiques, des levures et de leurs dérivés, m'autorisant parfois à réagir ou nuancer des affirmations ou des généralisations sur les probiotiques (voir [Foligné et Pot, 2009, en Annexe](#)). Sans m'accrocher à un « doute » systématique, je reconnais avoir une vision prudente et pragmatique du domaine des Probiotiques en m'appuyant davantage sur des effets établis directs et concrets que d'entretenir des hypothèses multiples, difficiles à démontrer.

Je crois en effet qu'il est au moins aussi important d'identifier un effet biologique dans une application définie et de comprendre les conditions d'obtention de cet effet, par exemple dans le cadre d'un probiotique spécifique, en étudiant sa diversité vis-à-vis

d'autres souches, leurs mélanges possibles, l'impact de la dose, la durée de traitement, des processus d'inactivation ..., plutôt que de tenter de définir pour un organisme donné les différentes voies possibles d'activation et d'en déduire des mécanismes généraux pour de futures applications, dont il faudra de toute façon valider les effets.

D'un autre côté, si des données éparses utilisant une ou deux souches dans un modèle précis sont utiles pour identifier un effet, elles ne permettent pas de définir : « Comment ça marche ? » ou « une autre souche aurait-elle ou non la même efficacité ? et pourquoi ? »,

En d'autres termes, la question est « Avons-nous besoin de l'élucidation complète d'un mécanisme pour sélectionner des (nouveaux) candidats probiotiques prometteurs ? » ou « les meilleurs candidats sélectionnés, sur la base de modèles fiables et performants, sont ils des outils essentiels pour comprendre les mécanismes ? ».

La réponse est probablement entre les deux ; une comparaison triviale peut se faire avec l'Aspirine (Gilroy, 2005) « [...] qui est toujours restée une drogue énigmatique. Non seulement elle présente de nouveaux bénéfices pour traiter un nombre sans cesse étendu de nouvelles affections, mais parce que l'aspirine accroît notre compréhension de la nature de ces pathologies à travers la variété de réponses de l'hôte [...] ».

La démarche entreprise au laboratoire et à laquelle j'adhère, s'associe à ce compromis "dynamique", permettant (i) : la sélection de candidats potentiels en réalisant des incursions mécanistiques et, en retour (ii) : des hypothèses mécanistiques peuvent être documentées à l'aide de souches identifiées de performances différentes.

Cette approche maintient la possibilité de recourir à des techniques variées et des stratégies originales comme le furent l'utilisation de cellules dendritiques stimulées par des bactéries en transferts adoptifs, ou l'utilisation de molécules issues de pathogènes pour en détourner les effets d'échappements, conceptuellement séduisante ou encore l'exploration de la biodiversité de nouveaux candidats moins attendus.

Enfin, c'est à travers la mise en œuvre de ce projet de recherche «Mélodie» que j'entends bénéficier de ces précédents acquis techniques et connaissances et développer avec une plus grande autonomie mes aptitudes à coordonner et mener une recherche. Cette recherche, ambitieuse et nouvelle par plusieurs aspects, reste centrée sur les agressions de l'écosystème intestinal, les réponses immunes de la sphère digestive et le rôle de la flore, avec toujours un versant visant à limiter ces atteintes par des interventions ciblées. Ces notions de contamination/détoxification ouvrent également de nouveaux champs pour le laboratoire et, d'un point de vue personnel, me permettent de renouer avec l'approche intégrée du stress oxydatif, essentielle dans la problématique du vieillissement. Bien que le recours aux modèles cellulaires soit très présent dans ce projet, utilisant des lignées de cellules épithéliales (HT29, Caco 2, ...), ces derniers, malgré leur utilité, ont leurs limites (voir [Annexe 2, caryotype HT29](#)) et sont loin, à mon sens, de supplanter l'expérimentation animale.

Au-delà des aspects organisationnels et budgétaires, l'environnement humain est essentiel dans la conduite d'un tel projet. Je veillerai à instaurer parmi les différents collaborateurs, internes et extérieurs, des relations saines et respectueuses, offrant l'harmonie nécessaire à cette « Mélodie ».

Ces projets futurs vont en outre me permettre de développer davantage les « aspects pédagogiques » en restituant à mon tour, l'encadrement universitaire dont j'ai profité par le passé. Sans vouloir ici faire une profession de foi, j'attache beaucoup d'importance à la transmission des savoirs et savoir-faire qui vont au-delà des bonnes pratiques de laboratoire, et reposent sur un esprit critique et le sens de l'observation.

L'encadrement se définissant aussi par le respect des individus, de leur personnalité propre et de leurs priorités personnelles et professionnelles, je suis convaincu que travailler ainsi en adéquation et dans la sérénité est bien plus profitable que l'exigence du seul rendement et peut conduire à une recherche de qualité, quels que soient les critères d'évaluation (voir [Annexe 3](#)).

Pour faire écho à mon parcours (pêché) originel ... et futur, le "Vieillessement" n'est pas forcément associé à une perte d'adaptation et un "vieillessement avec succès" peut aussi se concevoir comme une biologie de la maturité où la programmation précoce est essentielle. Si les activités de recherche représentent de multiples stress dont certains sont néfastes, d'autres peuvent favoriser la charge allostatique du chercheur et les conditions d'une homéostasie dans son sens premier (recherche de l'équilibre). Au gré des stimuli chaud ou froid (Nice ou Lille), de la biodiversité régionale des boissons fermentées (par *CEnococcus œni* ou *Saccharomyces cerevisiae*), la résistance au stress s'organise et peut permettre l'expression de la résilience de l'individu.

Bibliographie

Bibliographie

- Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest.* 101(5):1020-7.
- Arora S, Anubhuti. 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity- a review. *Neuropeptides.* 40(6):375-401.
- Bach JF. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 347(12):911-20.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet.* 341(8850):938-41.
- Bermúdez-Humarán LG, Nouaille S, Zilberfarb V, Corthier G, Gruss A, Langella P, Issad T. 2007. Effects of intranasal administration of a leptin-secreting *Lactococcus lactis* recombinant on food intake, body weight, and immune response of mice. *Appl Environ Microbiol.* 73(16):5300-7.
- Blaut M, Collins MD, Welling GW, Doré J, van Loo J, de Vos W. 2002. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *Br J Nutr.* 87 Suppl 2:S203-11.
- Borenshtein D, McBee ME, Schauer DB. 2008. Utility of the *Citrobacter rodentium* infection model in laboratory mice. *Curr Opin Gastroenterol.* 24(1):32-7.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. 2004. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science.* 304(5667):108-10.
- Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryneck S, Peppelenbosch MP, Steidler L. 2006. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 4(6):754-9.
- Breton C, Lukaszewski MA, Risold PY, Enache M, Guillemot J, Rivière G, Delahaye F, Lesage J, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Vieau D. 2009. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296(3):E462-72.
- Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F, Løvik M, Macfarlane S, Meyer PD, M'Rabet L, Serafini M, van Eden W, van Loo J, Vas Dias W, Vidry S, Winklhofer-Roob BM, Zhao J. 2009. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr.* 101 Suppl 1:S1-45.
- Camp JG, Kanther M, Semova I, Rawls JF. 2009. Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. *Gastroenterology.* 136(6):1989-2002.
- Cani PD, Delzenne NM. 2009. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Jul 21, [Epub ahead of print].

Casabiell X, Piñeiro V, Tomé MA, Peinó R, Diéguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 82(12):4270-3.

Chen CC, Louie S, Shi HN, Walker WA. 2005. Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatr Res.* 58(6):1185-91.

Chrousos GP. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 5(7):374-81.

Collins SM, Bercik P. 2009. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology.* 136(6):2003-14.

Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D. 2008. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology.* 149(2):470-5.

de Palencia PF, Werning ML, Sierra-Filardi E, Dueñas MT, Irastorza A, Corbí AL, López P. 2009. Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-beta-D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4887-4891.

Foligné B., S. Nutten, C. Grangette, V. Dennin, D. Goudercourt, S. Poirer, J. Dewulf, D. Brassard, A. Mercenier and B. Pot. 2007. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology.* 13:236-43.

Frexinos J, Escourrou J, Lazorthes F, Pascal J, Fournanier G, Suduca P, Lemozy J, Duffaut M, Vinel J, Balas D, Bommelaer G, Voigt J. 1991. Grêle. Rappel histophysiologique. Dans : *Hépatogastroentérologie clinique*, Masson (ed.), Paris: Simep, pp. 136-43.

Gilroy DW. 2005. The role of aspirin-triggered lipoxins in the mechanism of action of aspirin. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 73(3-4):203-10.

Grangette C, Nutten 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(29):10321-6.

Guilmeau S, Buyse M, Bado A. 2004. Gastric leptin: a new manager of gastrointestinal function. *Curr Opin Pharmacol.* 4(6):561-6.

Hindlet P, Bado A, Kamenicky P, Deloménie C, Bourasset F, Nazaret C, Farinotti R, Buyse M. 2009. Reduced intestinal absorption of dipeptides via PepT1 in mice with diet-induced obesity is associated with leptin receptor down-regulation. *J Biol Chem.* 284(11):6801-8.

Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 292(5519):1115-8.

Ishikawa M, Tanasupawat S, Nakajima K, Kanamori H, Ishizaki S, Kodama K, Okamoto-Kainuma A, Koizumi Y, Yamamoto Y, Yamasato K. 2009. *Alkalibacterium thalassium* sp. nov., *Alkalibacterium pelagium* sp. nov., *Alkalibacterium putridalgicola* sp. nov. and *Alkalibacterium kapii*

sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolated from marine organisms and salted foods collected in Japan and Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(Pt 5):1215-26.

Kang H, Oh YJ, Ahn KS, Eom HJ, Han N, Kim YB, Sohn NW. 2009. *Leuconostoc citreum* HJ-P4 (KACC 91035) regulates immunoglobulin E in an ovalbumin-induced allergy model and induces interleukin-12 through nuclear factor-kappa B and p38/c-Jun N-terminal kinases signaling in macrophages. *Microbiol. Immunol.* 53:331-339.

Kekkonen R. 2008. Academic Dissertation presented by kind permission of the Medical Faculty of the University of Helsinki for public examination in Lecture Hall 2, Biomedicum Helsinki, Haartmaninkatu 8, on June 6th, 2008.

Masuda S, Yamaguchi H, Kurokawa T, Shirakami T, Tsuji RF, Nishimura I. 2008. Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. *Int J Food Microbiol.* 121:245-252.

Mercenier, A., P. Hols, Y. Roussel, G. Perez-Martinez, J. Buesa, M. Wilks, G. Pozzi, E. Remaut, L. Morelli, C. Grangette, V. Monedero, E. Palumbo, B. Foligné, L. Steidler, and S. Nutten. 2004. Screening and construction of probiotic strains with enhanced protective properties against intestinal disorders. *MEDH: Microbial Ecology in Health and Disease* (Suppl.), 16:86-95.

Neish AS. 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* 136(1):65-80.

O'Hara AM, Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7(7):688-93.

Pavan S, Desreumaux P, Mercenier A. 2003. Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10(4):696-701.

Payette H. 1996. Stratégies de prévention de la malnutrition chez les personnes âgées en perte d'autonomie à domicile. *Age & Nutrition.* 7:6-9.

Preidis GA, Versalovic J. 2009. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology.* 136(6):2015-31.

Rivière G, Michaud A, Breton C, VanCamp G, Laborie C, Enache M, Lesage J, Deloof S, Corvol P, Vieau D. 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension.* 46(5):1169-74.

Round JL, Mazmanian SK. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9(5):313-23. Review.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. 1983. The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp Gerontol.* 18(1):55-64.

Simon-Assman P, Kedinger M. 2000. Dans : *Biologie des épithéliums*, Clerici C et Friedlander G. (Editions EDK, Paris).

Sleator RD, Hill C. 2006. Patho-biotechnology: using bad bugs to do good things. *Curr Opin Biotechnol.* 17(2):211-6.

Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science.* 289(5483):1352-5.

Strachan DP. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 299(6710):1259-60.

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y. 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol.* 558(Pt 1):263-75.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature,* 449(7164):804-10.

Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J, Neiryneck S, Demetter P, Remaut E, Rottiers P, Steidler L. 2004. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology.* 127(2):502-13.

Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. 2000. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279(1):E83-7.

Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. 2005. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology.* 146(10):4211-6.

Wells JM, Mercenier A. 2008. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 6(5):349-62.

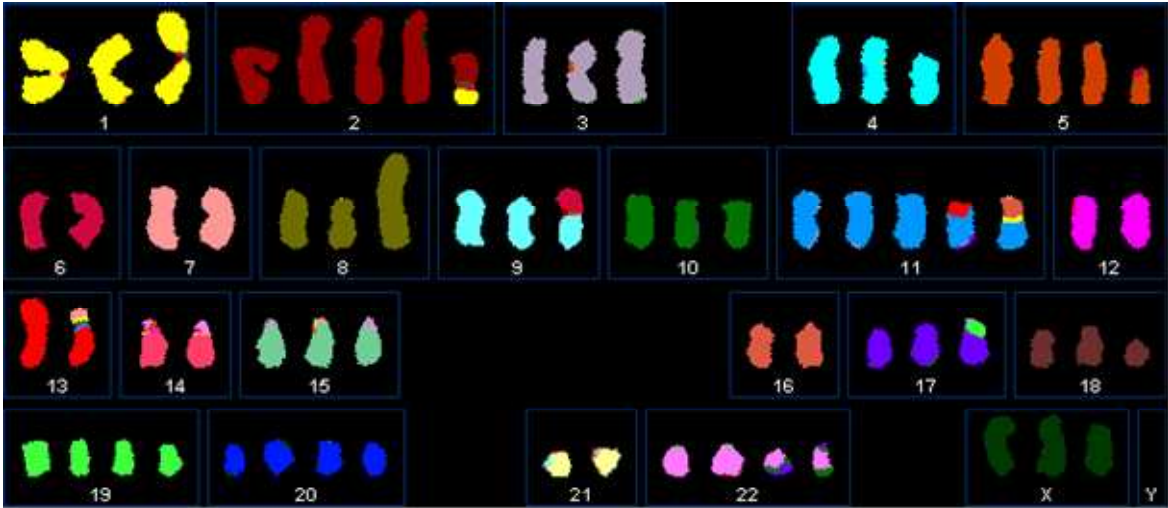
Wu X, Vallance BA, Boyer L, Bergstrom KS, Walker J, Madsen K, O'Kusky JR, Buchan AM, Jacobson K. 2008. *Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294(1):G295-306.

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(1):18-26.

Annexes

Annexes 2

Caryotype représentatif de la lignée cellulaire humaine HT-29, montrant les nombreux réarrangements et la polyploidie



Source : www.path.cam.ac.uk/.../LS411.html

Enfin, j'ai pleinement conscience de la nécessité d'évaluer la recherche et ses acteurs et trouve très noble de viser à atteindre une haute qualité. Toutefois, qu'il me soit permis d'exprimer ici une relative prudence face à une course « effrénée vers l'excellence et aux critères d'évaluation des travaux scientifiques pouvant conduire à des dérives. On voit ainsi aujourd'hui des articles où 3 voire 4 participants sont présentés comme « premiers auteurs ayant contribué de manière équivalente au travail »; des séquences multiples d'auteurs (et de contributions) non justifiées ; on peut encore citer des cas où un « reviewer » encense et porte aux nues un travail qu'un autre référé ajourne sans nuances. Il est alors délicat de s'appuyer sur des critères comptables de bibliométrie et on peut déplorer l'usage des qualificatifs « médiocre » et « acceptable » pour définir des journaux (voir Annexe 3, ci-contre). Si un travail peut effectivement être considéré de moindre qualité, je ne crois pas qu'« un journal » en entier (sa politique éditoriale, ses membres et ses auteurs) puisse être référencé et considéré comme médiocre.

Annexes 3



Interprétation des facteurs d'impact du JCR® Science Edition 2007 – Référentiel notoriétés Magri/Solari

Notoriété : **exceptionnelle** - **excellente** - **correcte** - **acceptable** - **médiocre**

Données ©2008 Thomson Reuters JCR® - Traitements ©INRA/Erist de Jouy/Crebi 2009 - Droits de diffusion en intranet INRA

GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY

1	GASTROENTEROLOGY	11,673
2	HEPATOLOGY	10,734
3	GUT	10,015
4	J HEPATOL	6,642
5	AM J GASTROENTEROL	6,101
6	GASTROINTEST ENDOSC	5,888
7	SEMIN LIVER DIS	5,814
8	CLIN GASTROENTEROL H	5,465
9	INFLAMM BOWEL DIS	4,705
10	NAT CLIN PRACT GASTR	4,415
11	ENDOSCOPY	4,166
12	AM J PHYSIOL-GASTR L	3,761
13	LIVER TRANSPLANT	3,751
14	NEUROGASTROENT MOTIL	3,364
15	CURR OPIN GASTROEN	3,271
16	ALIMENT PHARM THERAP	3,201
17	J VIRAL HEPATITIS	2,971
18	J CLIN GASTROENTEROL	2,938
19	DIS COLON RECTUM	2,621
20	LIVER INT	2,559
21	GASTROENTEROL CLIN N	2,526
22	PANCREATOLOGY	2,522
23	HELICOBACTER	2,423
24	PANCREAS	2,300
25	J GASTROINTEST SURG	2,272
26	J PEDIATR GASTR NUTR	2,102

(suite)

GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY

27	DIGESTION	2,097
28	COLORECTAL DIS	2,059
29	J GASTROENTEROL	2,052
30	CAN J GASTROENTEROL	2,030
31	BEST PRACT RES CL GA	1,992
32	DIGEST LIVER DIS	1,982
33	BMC GASTROENTEROL	1,975
34	INT J COLORECTAL DIS	1,918
35	HEPATOL RES	1,892
36	EUR J GASTROEN HEPAT	1,830
37	SCAND J GASTROENTERO	1,758
38	J GASTROEN HEPATOL	1,673
39	J HEPATO-BILIARY-PAN	1,658
40	DIGEST SURG	1,389
41	DIGEST DIS SCI	1,319
42	ABDOM IMAGING	1,213
43	DIS ESOPHAGUS	1,146
44	ACTA GASTRO-ENT BELG	1,096
45	REV ESP ENFERM DIG	1,089
46	DIGEST DIS	1,072
47	Z GASTROENTEROL	1,026
48	HEPATO-GASTROENTEROL	0,904
49	GASTROEN CLIN BIOL	0,846
50	CHIR GASTROENTEROL	0,110

Un amour, une carrière, une révolution: autant d'entreprises que l'on commence en ignorant leur issue.

J-P Sartre



