



**HAL**  
open science

# Caractérisation des propriétés anti-inflammatoires de souches commensales de *Streptococcus salivarius*

Ghalia Kaci

► **To cite this version:**

Ghalia Kaci. Caractérisation des propriétés anti-inflammatoires de souches commensales de *Streptococcus salivarius*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112427 . tel-01069898

**HAL Id: tel-01069898**

**<https://theses.hal.science/tel-01069898>**

Submitted on 30 Sep 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : **AgroParisTech**

Laboratoire de l'INRA, UMR1319 Micalis  
Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas

***DISCIPLINE: Biologie***

THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

**Microbiologie**

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Ghalia KACI**

Le 22 Juin 2012

**Caractérisation des propriétés anti-inflammatoires de souches  
commensales de *Streptococcus salivarius***

**Directeur de thèse : Christine DELORME**  
**Co-directeur de thèse : Hervé BLOTTIERE**

Chargé de recherche 1, Micalis UMR1319, INRA  
Directeur de recherche 2, Micalis UMR1319, INRA

**Composition du jury**

*Président du jury :*

Armel GUYONVARCH

Professeur, Univ.Paris-Sud XI,Gif/Yvette

*Rapporteurs :*

Corinne GRANGETTE

Chargé de recherche 1, INSERM, Institut Pasteur de Lille

Hélène BIERNE

Directeur de recherche 2, INRA, Institut Pasteur de Paris

*Examineurs :*

Gwenaël JAN

Chargé de recherche, AGROCAMPUS OUEST, INRA

Philippe MARTEAU

Professeur, Hôpital Lariboisière, Univ.Paris-XII, Paris

*À mes parents*  
*Mon frère et mes sœurs*  
*À Ramdane*

## Remerciements

*« Mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse ainsi qu'à la réussite de ces années de travail »*

Tout d'abord je tiens à adresser mes sincères remerciements à Dusko Ehrlich d'avoir accepté le financement de ces travaux dans le cadre du projet MetaHIT.

J'adresse mes vifs remerciements à Pierre Renault, qui m'a accueillie dans son équipe en Master, puis m'a donné l'opportunité de réaliser mon projet de thèse. Tu as toujours suivi les nouvelles de cette petite histoire « Interaction *S. salivarius*-Hôte ». Merci beaucoup pour la confiance et le soutien que tu m'as accordé en toutes circonstances.

Je souhaite remercier Joël Doré de m'avoir accueillie dans son groupe et pour ses conseils toujours très avisés. Merci pour toutes les discussions autour de mon sujet de thèse.

Je remercie Mmes Corinne GRANGETTE et Hélène BIERNE d'avoir accepté d'être rapporteurs et de consacrer de leur temps pour juger ce travail. Je tiens à remercier Mr Armel GUYONVARCH d'avoir accepté de présider le jury et également à Mr Philippe MARTEAU et Gwenaël JAN pour leurs implication en tant qu'examineurs dans le jury.

J'exprime ma profonde gratitude et mon respect à Christine, pour m'avoir suivie au cours de ces années d'étude comme directrice de thèse, pour sa disponibilité, sa patience et ses conseils avisés et pour son soutien quotidien. Je remercie également mon co-encadrant Hervé Blottière qui a dirigé et suivi la partie cellulaire. Merci à tous les deux vous m'avez apporté un très bon équilibre qui ma permis de passer ces années très sereinement.

Un grand merci à Omar Lakhdari pour son aide inestimable, ses suggestions sur le plan scientifique et en particulier sa bonne humeur.

Je voudrais remercier Eric Guédon pour ses conseils, son aide, son encouragement et les discussions sympathiques au tour de ce travail. Merci beaucoup Eric.

J'ai eu la chance au cours de ma thèse de travailler quelques temps à l'Institut Pasteur de Lille, et remercie le directeur de l'équipe Bruno Pot pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. J'adresse mes sincères remerciements à Catherine Daniel pour ses précieux conseils et pour m'avoir formé au monde de l'expérimentation animale. Je remercie également toute l'équipe pour l'ambiance, et tout particulièrement Sabine Poiret, Denise Goudercourt, et Véronique Dennin. Mes remerciements vont également à Benoit Foligné pour son aide et sans oublier la secrétaire Marie pour son assistance administrative. Merci beaucoup à tous pour votre accueil chaleureux.

Je tiens à remercier vivement Alain Guillot de la plate forme PAPPSO pour m'avoir permis de réaliser les expériences de purifications biochimiques dans son laboratoire, pour m'avoir transmis de précieuses connaissances en biochimie analytique, conseillée et guidée avec bienveillance. Un grand merci Alain, pour les séries d'analyse en spectrométrie de masse que tu as réalisé.

J'adresse mes chaleureux remerciements à l'ensemble de l'équipe « BAC » ; Nicolas Sanchez, Céline, Emmanuelle, Anne Laure, Séverine, Mathieu, Fouad, Victor, Benoit, Pierre Alain, Amira. Je remercie l'équipe des bio-informaticiens en particulier Nicolas Pons, Bouziane Moumène et les informaticiens ; Jean Michel et Pierre.

Mes vifs remerciements vont aux membres de l'équipe « FIne » ; Nico, Thomas, Saoussène, Elsa, Gosia, Antonella, Karine Le roux, Karine Gloux, Patricia et Marion.

J'adresse ma profonde gratitude à Emmanuelle Maguin pour m'avoir conseillé au cours de ces années. Je tiens aussi à remercier chaleureusement tous les membres de son équipe: Maarten, Samira, Moez, Gaetana, Dragana, Nadia, Alexec, Rozenn, Alexcendrine et Helène.

Mes remerciements iront également à l'équipe « Laverie/Préparation de Micalis » pour leur aide technique en particulier Ludevic, Véronique, Cindy et Christophe.

Un grand merci à mes amis, en particulier Ramdane Haddouche, Khalid, Zahia, Sonia, Ouerdia, Lynda, Ahcene, sa femme Fazia et leur petit ange qui m'ont soutenue et encouragée de loin ou de près. Mes vifs remerciement à ma tata Djidji, tonton Arezki et leurs enfants : Massi, Mélissa, Alexi et la petite Anaïs. Merci pour votre hébergement et votre précieuse aide pendant mes premières années en France.

Merci maman, merci papa, merci du fond du cœur pour votre amour et votre soutien, sans vos efforts et vos sacrifices je ne serai jamais arrivée aussi loin, je vous aime très fort. Vous êtes mon équilibre dans cette vie.

Un grand merci à mon frère Yazid, mes sœurs ; Karima, Fairouz et l'adorables Nadia. Au petit ange Méliza pour avoir accepté enfin le vide que j'ai laissé suite à mon départ à l'étranger.

Je ne peux pas oublier ceux qui nous ont quittés, mes très chers grands parents qui m'ont considéré comme un rayon de soleil venant de loin pour éclairer leur vie.

Ramdane, merci pour ta patience, ton soutien, ta présence et tes mots d'encouragements. Ta confiance m'a donné la force de surpasser toutes les difficultés pour atteindre l'objectif.

## Résumé

Les bactéries commensales digestives jouent un rôle primordial dans l'homéostasie épithéliale et la santé de l'hôte, avec notamment un rôle modulateur du système immunitaire. Des effets bénéfiques dans le traitement des pathologies inflammatoires intestinales ont été caractérisés chez certaines souches de bactéries commensales. La compréhension de ces effets dans le maintien de l'homéostasie intestinale repose sur la connaissance des interactions entre les bactéries, l'épithélium intestinal et le système immunitaire muqueux. *Streptococcus salivarius* est l'un des premiers colonisateurs de la cavité buccale et du tractus digestif de l'homme. Cette bactérie a été utilisée comme modèle pour rechercher des mécanismes impliqués dans l'homéostasie.

La recherche d'interactions entre des souches de l'espèce *S. salivarius* et les cellules humaines a été réalisée pour caractériser leurs éventuelles propriétés immunomodulatrices. Nous avons montré que les bactéries vivantes et les surnageants de cultures des souches de cette espèce modulent la réponse inflammatoire *in vitro* via un effet inhibiteur sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales intestinales (HT-29 et Caco-2) et les monocytes (THP-1). Cette modulation de l'inflammation a été confirmée par la capacité des surnageants bactériens à inhiber la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales. Ces surnageants agissent *via* une étape impliquant I $\kappa$ B- $\alpha$ , un inhibiteur du facteur NF- $\kappa$ B. Ils inhibent la dégradation de la protéine I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylée et diminuent ainsi la translocation nucléaire des composants NF- $\kappa$ B. Nous avons également identifié et caractérisé un métabolite bactérien présent dans ces surnageants exerçant cette activité anti-inflammatoire. L'utilisation de ce métabolite et son isomère miment *in vitro* l'effet inhibiteur des surnageants sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales et les monocytes. Nous avons ainsi caractérisé un métabolite sécrété par la bactérie commensale *S. salivarius* qui est capable d'inhiber une des voies centrales de signalisation impliquée dans la réponse inflammatoire intestinale. Enfin, une capacité anti-inflammatoire de *S. salivarius* a également été montrée dans un modèle murin d'inflammation digestive dans lequel les bactéries métaboliquement actives ont protégé les animaux de colites induites avec du TNBS.

Ces travaux ouvrent la voie pour le développement d'applications thérapeutiques dans le traitement de pathologies inflammatoires de l'intestin basées sur ce composé actif ou l'utilisation de *S. salivarius* comme probiotique.

**Mots clefs :** *Streptococcus salivarius*, voie de signalisation NF- $\kappa$ B, effet anti-inflammatoire, cellules épithéliales intestinales, monocytes.

## Abstract

Commensal bacteria play a vital role in epithelial homeostasis and host health, including a modulatory role of the immune system. Their beneficial effects in the treatment of inflammatory bowel disease have been characterized in some strains of commensal bacteria. Understanding these effects in maintaining intestinal homeostasis is based on the knowledge of interactions among bacteria, the intestinal epithelium and the mucosal immune system. *Streptococcus salivarius* is one of the first colonizers of human oral cavity and digestive tract. This bacterium was used as a template to investigate mechanisms involved in homeostasis.

The research for interactions between strains of *S. salivarius* species and human cells was performed to characterize their possible immunomodulatory properties. We have shown that living bacteria and culture supernatants of strains of this species modulate the inflammatory response *in vitro* via an inhibitory effect on the activation of NF- $\kappa$ B in intestinal epithelial cells (HT-29 and Caco-2) and monocytes (THP-1). This modulation of inflammation was confirmed by the ability of bacterial supernatants to suppress the secretion of IL-8 by epithelial cells. These supernatants act via a step involving I $\kappa$ B- $\alpha$ , an inhibitor of NF- $\kappa$ B. They inhibit the degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylated protein and thus decrease the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B components. We also identified and characterized a bacterial metabolite present in these supernatants exercising this anti-inflammatory activity. Use of this metabolite and its isomer *in vitro* mimic the repressive effect of supernatants on activation of NF- $\kappa$ B in epithelial cells and monocytes. We have characterized a metabolite secreted by commensal bacterium *S. salivarius* that is capable of inhibiting one of the central signaling pathways involved in the intestinal inflammatory response. Finally, an anti-inflammatory capacity of *S. salivarius* was also shown in a mouse model of gastrointestinal inflammation in which the metabolically active bacteria protected the animals from colitis induced with TNBS.

This work paves way for the development of therapeutic applications in the treatment of inflammatory bowel disease based on the active compound or the use of *S. salivarius* as a probiotic.

**Keywords:** *Streptococcus salivarius*, NF- $\kappa$ B signaling pathway, anti-inflammatory effect, intestinal epithelial cells, monocytes.

## Abréviations

AGCC	: Acides Gras à Chaine Courte
AMPs	: Antimicrobial peptides
AP-1	: Activator protein 1
APRIL	: a proliferation-inducing ligand
ASC	: apoptosis-associated speck-like protein
ASFV	: African swine fever virus
BAFF	: B-cell Activating Factor
Bb	: Bifidobacterium breve C50
BCL3	: B cell CLL/lymphoma 3
BCR	: B cell receptor
b-TrCP	: Beta transducin repeat containinig protein
CARD	: Caspase-activation and recruitment domain
CBP	: CREB Binding Protein
CCL20	: CC-chemokine ligand 20
CD	: Cellules dendritiques
CDK6	: Cyclin Dependant Kinase 6
CFU	: Colony forming unit
CK1 $\alpha$	: Casiene kinase 1 $\alpha$
CK2	: Casein Kinase 2
CLR	: C-type lectin receptor
COX2	: Cyclo-Oxygenase 2
CSF	: Competence and Sporulation Factor
CYLD	: Cylindromatosis
DO	: Densité optique
DSS	: Sulfate de Dextran Sodique
DUB	: Ubiquitin-Binding Domain
FDA	: Food and Drug Administration
Fiaf	: Fasting-induced adipocyte factor
fMLP	: n-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FMOC-Cl	: Fluorenylmethyloxy-carbonylchloride
GALT	: Gut- associated lymphoïd tissue
G-CSF	: Gralunocyte Colony-Stimulating Factor
HDAC	: Histone Déacétylase
Hsp27	: Heat shock protein 27
IBD	: Inflammatory Bowel Disease
ICAM-1	: Intracellular Adhesion Molecule 1
IECs	: Intestinal Epithelial cells
IgA	: Immunoglobuline A
IKK	: Inhibiteur of $\kappa$ B Kinase
IL-1R	: IL-1 receptors
IRAK-1	: IL-1R associated kinase 4
IRF	: Interferon regulatory factors
LPL	: Lipoprotéine lipase
LPS	: Lipopolysaccharide
LTA	: Acide lipoteichoïque

LT $\beta$	: Lymphotoxine B
LZ	: Leucine Zipper
MAMP	: Microbial-associated molecular pattern
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MC	: Maladie de Crohn
MCD	: Milieu Chimiquement Défini
MCP	: Monocyte Chemotactic Protein
MICI	: Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MMP-9	: Matrix MetalloProteinase 9
MSK1	: Mitogen-and Stress-activated protein Kinase 1
MyD88	: Myeloid differentiation primary response gene 88
MyD-88s	: Short MyD-88
NBD	: NEMO Binding Domain
NEMO	: NF- $\kappa$ B Essential Modulator
NF- $\kappa$ B	: Nuclear factor- $\kappa$ B
NIK	: NF- $\kappa$ B Inducing Kinase
NLR	: Nod-like receptor
NOD	: Nucleotide-binding oligomerisation domain
NSAIDS	: Nonsteroid anti inflammatory drugs
OAS	: O-acétyl-sérine
ON	: Over Night
PBMCs	: Peripheral blood mononuclear cells
PDZ	: Postsynaptic density 65-discs large-zonula occludens 1
pIgR	: Polymeric Ig recepteur
PKA	: Protéine Kinase A
PKC $\zeta$	: Protein Kinase C $\zeta$
PRR	: Pattern recognition receptor
PYD	: Pyrine domain
RANKL	: Receptor-Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
RH	: Rectocolite hémorragique
RHD	: Rel Homology Domain
RIP	: Receptor-Interacting Protein
RIP1	: Receptor interacting protein 1
RLR	: Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor.
ROS	: Reactive Oxygène Species
rpm	: Rotation par min
SARM	: Sterile-alpha and Armadilo motif-containing
SCF b-TrCP	: Skp1-Cullin-protéine à boîte F ; ou F est la beta-TrCP
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SIGIRR	: Single immunoglobulin IL-1R-related molecule
SM	: Spectrométrie de masse
SMRT	: Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormon Receptor
SNC	: Système Nerveux Central
SOD2	: Superoxyde Dismutase 2
SYK	: Spleen Tyrosine Kinase
TAD	: Transcription Activation Domain
TAK1	: TGF- $\beta$ -activated kinase1

TCR	: T cell receptor
TFA	: Acide trifluoroacétique
TGF $\beta$	: Transforming growth factor- $\beta$
TIRAP/Mal	: TIR domain containing adaptator protein/MyD88 adaptator-like protein
TLR	: Toll-like receptor
TNBS	: 2, 4,6-TriNitroBenzene Sulfonic acid
TNFR	: TNF receptors
Tollip	: Toll- interacting protein
TPL-2	: Tumor Progression Locus-2
Tr	: Temps de rétention
TRADD	: TNF receptor associated death domain protein
TRAF	: TNF Receptor Associated Factor
TRAM	: TRIF – related adaptator molecule
Treg	: T regulateur
TRIF	: TIR domain containing adaptator inducing IFN $\beta$
TSLP	: Thymic Stromal Lymphopoitin
TWEAK	: TNF like weak inducer of apoptosis
VCAM-1	: Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	: Vascular Enthothelial Growth Factor

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>7</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>10</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapitre I : Le Microbiote du tractus digestif humain</b> .....	<b>15</b>
I. Mise en place et évolution du microbiote digestif.....	15
I.1. Acquisition du microbiote.....	15
I.1.1. Microbiote buccal .....	15
I.1.2. Microbiote intestinal.....	16
I.2. Composition du microbiote .....	17
I.2.1. Composition du microbiote buccal .....	17
a. Dents.....	19
b. Surfaces des muqueuses .....	20
I.2.2. Composition du microbiote intestinal.....	22
I.3. Répartition du microbiote digestif.....	25
II. Grandes fonctions du microbiote du tractus digestif .....	26
II.1. Métabolisme microbien et rôle nutritionnel .....	26
II.2. Protection contre les micro-organismes néfastes .....	29
I.1.1. Au niveau buccal .....	29
II.2.1. Au niveau intestinal.....	29
II.3. Physiologie intestinale et développement du tube digestif .....	30
II.4. Education du système immunitaire .....	30
II.4.1. Au niveau buccal .....	31
II.4.2. Au niveau intestinal.....	31
II.5. Autres fonctions du microbiote .....	32
<b>Chapitre II : L'épithélium digestif et son système immunitaire</b> .....	<b>34</b>
I. Épithélium digestif et l'homéostasie intestinale .....	34
I.1. Anatomie du tube digestif .....	34
I.2. Épithélium intestinal .....	35
II. Système immunitaire associé à l'intestin.....	37

II.1. Plaque de Peyer .....	38
II.2. Ganglions mésentériques .....	40
III. Stratégies de protection mucoale .....	40
III.1. L'épithélium intestinal, première ligne de défense .....	41
III.1.1. Barrière épithéliale ; ligne physique .....	41
III.1.2. Sécrétion du mucus.....	41
III.1.3. Sécrétions des peptides anti-microbiens .....	42
III.1.4. Sécrétion de cytokines et chimiokines .....	44
III.2. Activation de la réponse immunitaire innée.....	44
III.2.1. Reconnaissance des antigènes microbiens par les PRR .....	44
III.2.2. Différentes classes de PRR et leur localisation.....	45
a. Les récepteur Toll-like (TLR) .....	45
a.1. TLR membranaires .....	46
i. TLR endosomaux.....	47
b. Les récepteurs Nod-like (NLR) .....	47
III.2.3. Différentes signalisations via PRR .....	49
a. Signalisation dépendante de MyD88.....	50
b. Signalisation dépendante de TRIF .....	51
c. Signalisation via les NLRs .....	51
III.2.4. Autres classes de PPR et leurs fonctions.....	52
III.3. Activation de la réponse immunitaire adaptative .....	52
III.3.1. Activation des lymphocytes T .....	53
III.3.2. Activation des lymphocytes B .....	55
<b>Chapitre III : NF-<math>\kappa</math>B élément clef de la réponse immunitaire et inflammatoire .....</b>	<b>57</b>
I. Généralités .....	57
I.1. Sous-unités NF- $\kappa$ B.....	58
I.2. Inhibiteurs I $\kappa$ B.....	59
I.3. Complexe IKK .....	60
I.4. Activation NF- $\kappa$ B .....	61
I.4.1. Voie classique (canonique) .....	62
I.4.2. Voie alternative (non canonique) .....	63
II. Différentes cascades de signalisation NF- $\kappa$ B .....	64
II.1. Du récepteur vers IKK .....	65
II.2. Formation du complexe IKK.....	66
II.2.1. Complexe canonique NEMO/IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ .....	67
II.2.2. Complexe non canonique IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ .....	67
II.3. Libération de NF- $\kappa$ B de leurs inhibiteurs I $\kappa$ B .....	68

II.4. Translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau et transcription.....	68
II.5. Transcription et régulation des gènes cibles .....	70
III. Régulation de la réponse NF- $\kappa$ B et retour à l'homéostasie.....	71
III.1. Régulation négative de la voie classique .....	71
III.1.1. Resynthèse d'I $\kappa$ B.....	71
III.1.2. Déubiquitinasés en amont d'IKK .....	72
III.1.3. Dissociation des complexes de signalisation.....	73
III.1.4. Terminaison de la réponse NF- $\kappa$ B classique dans le noyau .....	74
III.2. Régulation négative de la voie alternative .....	76
IV. Gènes cibles de NF- $\kappa$ B.....	76
V. Inhibition de l'activation NF- $\kappa$ B par de petites molécules.....	77
VI. NF- $\kappa$ B dans l'intestin : de l'homéostasie à l'inflammation.....	80
VI.1. NF- $\kappa$ B et le maintien de l'homéostasie intestinale.....	81
VI.1.1. Rôle de NF- $\kappa$ B dans l'homéostasie physiologique .....	81
VI.1.2. NF- $\kappa$ B et l'infection par les micro-organismes pathogènes.....	82
VI.1.3. NF- $\kappa$ B et dommages tissulaires .....	84
VI.2. NF- $\kappa$ B et l'inflammation intestinale.....	85
VI.2.1. NF- $\kappa$ B dans la destruction inflammatoire de l'intestin .....	85
VI.2.2. NF- $\kappa$ B chez les patients atteints des pathologies inflammatoires intestinales .....	87
<b>Chapitre IV : Dialogue microbiote-hôte : décryptage d'un langage complexe.....</b>	<b>89</b>
I. Tolérance immunitaire des bactéries commensales .....	89
I.1. Mécanismes de tolérance mis en place par la cellule épithéliale.....	89
I.2. Expression des PRR .....	90
I.2.1. Compartimentation des PRRs .....	90
I.2.2. Polarisation des PRRs .....	91
I.2.3. Absence de réponse des PRRs à la surface .....	93
I.3. Signalisation <i>via</i> les TLR .....	93
I.4. Régulations négatives de la signalisation <i>via</i> les TLR.....	94
I.5. Sécrétion de cytokines par IECs .....	97
I.6. Rôle du microbiote.....	98
I.7. Expression et stimulation des TLRP .....	98
I.8. Modulation de la signalisation pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B .....	100
I.8.1. Modulation ciblant l'inhibiteur I $\kappa$ B .....	100
I.8.2. Modulation dépendante de PPAR $\gamma$ .....	100
I.8.3. Modulation dépendante des métabolites bactériens.....	101
II. Rupture de tolérance microbiote-hôte et pathologies intestinales.....	101
II.1. Pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin .....	101

II.2. Dysbiose du microbiote chez les patients atteints des MICI .....	103
II.3. Utilisation de bactéries bénéfiques dans le traitement des MICI .....	104
III. Composants bactériens aux effets immunomodulateurs.....	105
III.1. ADN.....	105
III.2. Composants de surface.....	105
III.3. Surnageants de culture .....	106
<b>Contexte et objectifs .....</b>	<b>107</b>
I. Contexte .....	107
II. Objectifs .....	108
<b>Résultats .....</b>	<b>111</b>
I. Liste des publications .....	111
II. Autres résultats .....	111
I.1. Article N°1: Inhibition of the NF-kappaB pathway in human intestinal epithelial cells by commensal <i>Streptococcus salivarius</i> .....	112
I.2. Article N° 2: Anti-inflammatory properties of <i>Streptococcus salivarius</i> a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract .....	122
II. Autres résultats.....	149
II.1. Caractérisation du composé anti-inflammatoire sécrété par la bactérie commensale <i>streptococcus salivarius</i> .....	150
II.2. Mécanisme d'action du composé inhibiteur de la voie NF-κB, sécrété par la bactérie commensale <i>Streptococcus salivarius</i> .....	170
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>183</b>
I. Propriétés anti-inflammatoires de <i>S. salivarius</i> .....	185
II. Caractérisation de la molécule aux propriétés anti-inflammatoires sécrétée par <i>S. salivarius</i> .....	187
III. Mécanismes impliqués dans l'effet anti-inflammatoire de <i>S. salivarius</i> au niveau des cellules épithéliales intestinales .....	189
IV. Propriétés anti-inflammatoires de <i>S. salivarius</i> sur la colite induite au TNBS.....	191
<b>Listes de publications et communications .....</b>	<b>195</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>199</b>

# *Introduction*

# Introduction

## Chapitre I : Le Microbiote du tractus digestif humain

Les êtres humains naissent stériles et donc sans contact préalable avec tous types de micro-organismes. Après les premiers moments de la découverte du monde du vivant, l'Homme entame une vie associative avec une multitude de populations microbiennes désignées sous le nom de « microbiote ». Cet univers mal défini de micro-organismes est présent sur toutes les surfaces (peau) et les cavités (vagin, bouche et intestins) du corps humain. Cependant, la majeure partie du microbiote de l'être humain est localisée au niveau du tractus digestif.

### I. Mise en place et évolution du microbiote digestif

#### I.1. Acquisition du microbiote

Le microbiote du tractus digestif qui regroupe à la fois le microbiote buccal et intestinal est un écosystème<sup>1</sup> extrêmement complexe et dynamique de micro-organismes. Il est maintenant admis que cet écosystème est un organe à part entière acquis après la naissance (Bocci, 1992). Le fœtus humain évolue *in utero* dans un environnement stérile et la colonisation microbienne débute dès la naissance. Cependant, des études récentes réalisées chez la souris ont mis en évidence que certaines bactéries du tube digestif de la mère sont capables de traverser le liquide amniotique jusqu'au tractus digestif du fœtus (Jimenez et al., 2005; Jimenez et al., 2008). Cette observation suggère que la colonisation du tube digestif pourrait commencer avant la naissance.

##### I.1.1. Microbiote buccal

Le microbiote buccal humain est hautement complexe et diverse. Il est composé d'une population très hétérogène de micro-organismes dont un grand nombre de bactéries auquel peut être ajouté des protozoaires, des levures et des mycoplasmes. La cavité buccale du nouveau-né, stérile à la naissance, est rapidement (en quelques heures) colonisée par un microbiote provenant essentiellement des contacts humains, principalement avec la mère, mais également de contacts animaux et de l'environnement local (Kononen, 2000). La dynamique de colonisation et la mise en place de ce microbiote du nourrisson dépend, en plus de ces expositions, de l'ensemble des conditions physico-chimiques du biotope buccal.

---

<sup>1</sup> Ecosystème est défini comme étant l'ensemble des structures relationnelles qui lient les êtres vivants entre eux et à leur environnement inorganique (Elleberg 1943)

Dans les premières phases d'acquisition, le microbiote buccal est constitué d'un nombre restreint d'espèces bactériennes avec une dominance des streptocoques. Ces premiers colonisateurs de la cavité buccale sont principalement les trois espèces *Streptococcus mitis biovar1*, *Streptococcus oralis* et *Streptococcus salivarius* (Pearce et al., 1995). Ensuite, il se complexifie progressivement sous l'influence de multiples facteurs notamment les habitudes alimentaires. Pendant la première année de vie, le microbiote oral contient principalement des *Streptocoques*, *Staphylocoques* et quelques espèces de *Lactobacillus* et d'*Actinomyces* (Kononen et al., 1992). Au contraire, des espèces comme *Streptococcus sanguis* et *Streptococcus mutans*, colonisent la cavité buccale après l'éruption dentaire (Smith et al., 1993). Ensuite, le nombre et la fréquence des isolats de bactéries anaérobies strictes augmentent. De plus, durant l'adolescence, on observe une augmentation du nombre des anaérobies à pigmentation noire et les spirochètes dans les crevasses gingivales en raison des changements hormonaux (Gusberti et al., 1990).

Des études ont démontré que les changements les plus importants du microbiote buccal se produisent chez les personnes âgées. Ces changements incluent une prédominance des Staphylocoques et Lactobacilles après l'âge de 70 ans et une augmentation de la proportion de *Candida* après l'âge de 80 ans (Marsh et al., 1992). Ce changement observé dans la composition du microbiote des individus âgés serait lié à une diminution du flux salivaire, diminution de l'efficacité du système immunitaire ainsi qu'à une déficience nutritionnelle (Percival et al., 1994).

### **I.1.2. Microbiote intestinal**

Après la naissance, en absence des mécanismes immunitaires matures, le tube digestif du nouveau-né est un habitat particulièrement permissif aux différents micro-organismes de son environnement. Les niveaux de population microbienne atteignent rapidement  $10^{11}$  bactéries voir même plus par gramme de fèces. L'évolution dans les séquences de la colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé, sous la dépendance de facteurs endogènes et exogènes. Les facteurs endogènes regroupent l'ensemble de sécrétions du tube digestif mais aussi de produits des premiers micro-organismes colonisateurs qui conditionnent globalement l'environnement physico-chimique du tractus digestif. Les facteurs exogènes incluent l'exposition aux micro-organismes d'origine maternelle (fécale, vaginale et cutanée), qui est différente selon la voie de naissance (naturelle ou par césarienne) (Adlerberth and Wold, 2009; Biasucci et al., 2008; Dominguez-Bello et al., 2010). Il y a également l'environnement extérieur (Gill et al., 2006) et le type d'alimentation (lait maternel *versus*

préparations industrielles). Des études ont montré que le lait maternel pourrait être un vecteur de micro-organisme de la mère vers le nourrisson (Perez et al., 2007). Enfin, l'antibiothérapie prescrite dans certains cas peut avoir des effets perturbateurs majeurs sur la colonisation du nouveau-né (Gronlund et al., 1999; Koenig et al., 2011).

Le microbiote du tube digestif est d'abord constitué d'un nombre restreint d'espèces bactériennes, avec une dominance des *Bifidobacterium* et des *Bacteriodes*. Bien que, les bactéries anaérobies dominantes du microbiote intestinal de l'adulte fassent partie des premiers microbes rencontrés lors de la naissance par voie basse, elles ne se développeront en dominance dans l'intestin du nourrisson que lorsque les anaérobies facultatives auront consommé l'oxygène présent. Ce premier relais d'espèces s'opère durant les premières heures qui suivent la naissance.

Des études récentes réalisées chez l'animal montrent que certaines espèces anaérobies colonisantes modifient leur métabolisme après sevrage (Bjursell et al., 2006). L'hygiène qui entoure la naissance et les premiers moments de la vie conditionnent fortement la dynamique et les étapes de colonisation. En effet, il apparaît aujourd'hui clairement que la colonisation par des espèces commensales habituelles comme *Escherichia coli* est retardée dans les pays industrialisés par rapport au passé et par rapport au pays en voie de développement. Ces observations seraient la conséquence des conditions d'hygiène stricte appliquée ces dernières années (Nowrouzian et al., 2003). Des bactéries habituellement associées à la peau (*Staphylococcus* sp.) apparaissent alors dans le microbiote dominant précoce (Lindberg et al., 2004). Une naissance par césarienne est souvent associée à une acquisition retardée des groupes dominants usuels et d'une présence plus fréquente de bactéries d'origine environnementale que dans le cas de naissance par voie basse.

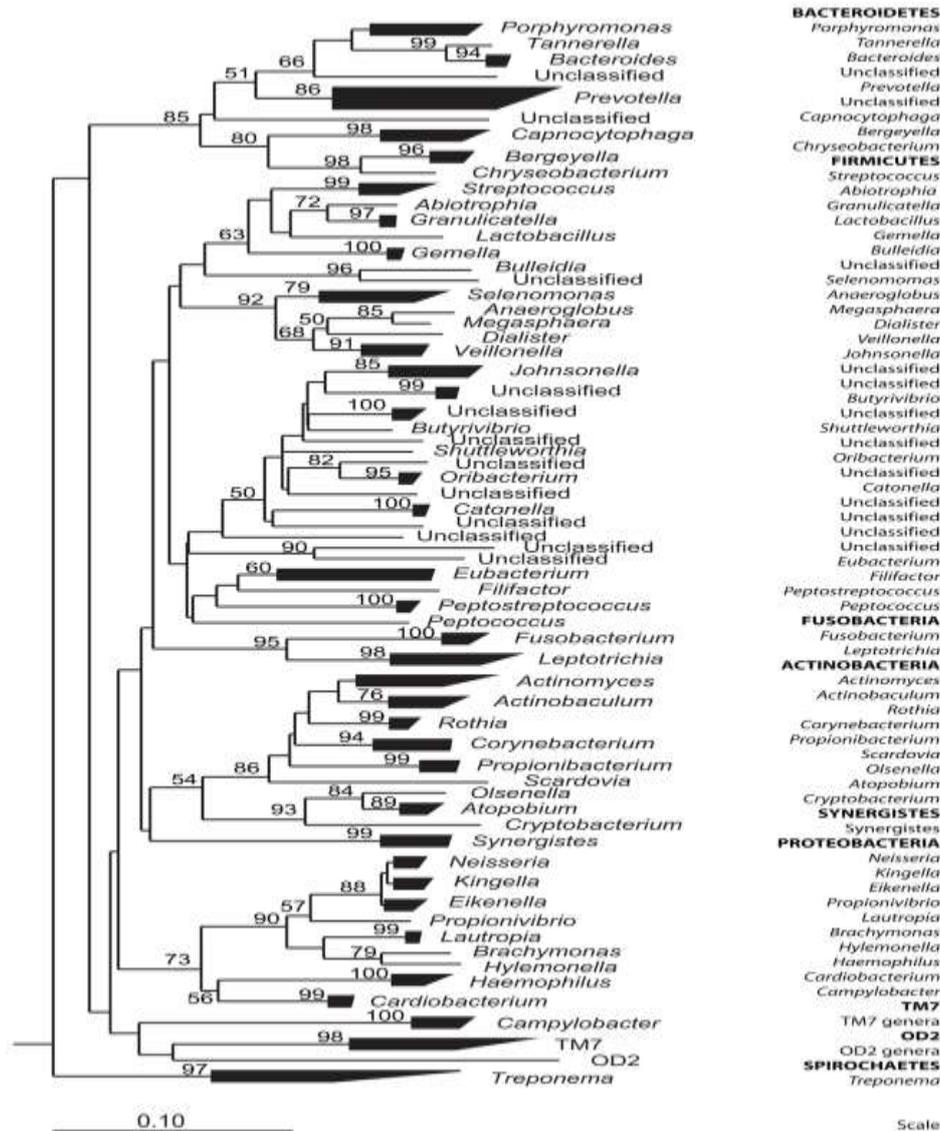
Ensuite la composition du microbiote évolue et se complexifie progressivement sous l'influence de multiples facteurs notamment l'environnement et les habitudes alimentaires de l'hôte. Enfin, ce microbiote se stabilise vers l'âge de deux ans et son profil devient mature et fonctionnellement stable (Midtvedt and Midtvedt, 1992).

## **I.2. Composition du microbiote**

### **I.2.1. Composition du microbiote buccal**

Le microbiote buccal est une population dynamique constitué d'environ 500 à 700 espèces bactériennes (Aas et al., 2005). Ces différentes espèces cohabitent en équilibre et sont généralement non pathogènes.

L'analyse moléculaire du gène de l'ARN ribosomique 16S des échantillons provenant des différents sites de la cavité buccale montre que ce microbiote est composé de neuf *phyla* bactériens : Firmicutes (33.2%), Proteobacteria (27.5%), Bacteroidetes (16.6%), Actinobacteria (14.5%), Fusobacterium (6.7%), Candidate division TM7 *incertae sedis* (1.3%) et une proportion (<1%) des Spirochaetes, OD2 et les Synergistes (**Figure 1**).



**Figure 1 : Arbre phylogénétique des principaux groupes et genres bactériens résidant au niveau de la cavité buccale humaine (Bik et al., 2010)**

Le pyroséquençage 454 des échantillons provenant des différentes niches internes de la bouche (surface des dents, muqueuses, langue et la salive) montre aussi que le microbiote buccal est caractérisé par la dominance de quatre grands *phyla* bactériens : Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes et en sous dominance du phylum des Fusobacteria (Zaura et al., 2009). Le phylum des Firmicutes le plus fortement représenté

(33.2%) comprend le genre des *Streptococcus*, des *Granulicatella* et la famille des *Veillonelleceae*. Le phylum des Proteobacteria comprend les genres *Neisseria* et *Haemophilus*, le phylum Actinobacteria quant à lui comprend les genres: *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*. En fin, le phylum de Bacteroidetes comprend les genres : *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*. Le phylum sous dominant Fusobacteria comprend le genre : *Fusobacterium* (Zaura et al., 2009).

La composition du microbiote buccal humain, bien que très conservée au niveau des *phyla* et des grands groupes bactériens, présente des différences intra-individuels au niveau des espèces et des souches bactériennes (Bik et al., 2010). De plus, ce microbiote présente des populations microbiennes complètement différentes au niveau des taxons et des espèces de celles retrouvées dans le microbiote intestinal. Ces observations suggèrent que le microbiote de la bouche est divers et unique pour chaque individu.

Nous avons vu que les espèces bactériennes buccales évoluent en fonction de l'âge de l'hôte, mais aussi en fonction des différents compartiments buccaux. Chaque compartiment est caractérisé par une variabilité physico-chimique très importante et également par deux structures anatomiques remarquables ; une structure dure représentée par les dents et une structure douce représentée par les muqueuses. La composition et la distribution du microbiote de cet écosystème varient donc quantitativement et qualitativement dans les différents compartiments buccaux (Aas et al., 2005). Certaines bactéries comme *Streptococcus sanguis*, *S. mutans* et *Actinomyces viscosus* sont retrouvés en grand nombre sur les dents, pendant que *Streptococcus salivarius* est isolé principalement sur la langue et dans la salive (Hamada and Torii, 1980; Listgarten, 1976; Papaioannou et al., 2009).

#### **a. Dents**

Ce sont des structures dures mais avec des surfaces et des sites (subgingival et supragingival) favorables à la colonisation par des micro-organismes. Les surfaces des dents sont colonisées par des masses très denses (environ  $10^{11}$  bactéries/g de poids mouillé) de micro-organismes formant ainsi la plaque dentaire (Marsh et al., 1992). Cette dernière est une communauté microbienne organisée dans une matrice composée de produits de sécrétions microbiens et de composés de la salive.

D'une manière générale, la plaque dentaire se développe préférentiellement sur des surfaces protégées des frottements mécaniques tels que les régions entre les dents (surfaces approximales), la région subgingivale (crevasse gingival) et les différentes surfaces après fissures.

La colonisation de la plaque dentaire par les micro-organismes varie dans le temps ; quelques minutes après le brossage des dents, les premiers colonisateurs (prédominants) sont les bactéries à coloration Gram-positives et les anaérobies facultatifs comme streptocoque viridans et Actinomycètes (Marsh et al., 1992; Papaioannou et al., 2009). Les espèces bactériennes prédominantes dans ce site sont ; *S. mitis*, *S. mitis biovar 2*, *S. infantis*, *Granulicatella elegans*, *G. hemolysans* et *Neisseria subflava* (Aas et al., 2005). La proportion et les types bactériens qui s'installent initialement sur cette plaque dentaire dépendent de leur affinité aux récepteurs présents sur la surface des dents ainsi que de leurs proportions dans la salive. Une étude récente a montré que chez les enfants, la composition de la salive varie en fonction de différents stades de la dentition et en fonction de l'âge de l'individu, suggérant une influence de ces facteurs sur la colonisation de la plaque dentaire (Crielaard et al., 2011). Les bactéries à coloration Gram négative et à forme filamenteuse persistent en nombre important sur la plaque dentaire pendant plusieurs jours. Enfin, après plusieurs semaines, d'autres flores diverses en sous-dominance se rajoutent sur cette plaque comme les spirochètes (Scannapieco, 1994).

Dans une crevasse subgingivale saine, le nombre total de bactéries cultivables est relativement faible ( $10^3$  à  $10^6$  CFU/ crevasse). La plaque subgingivale est aussi dominée par des organismes à coloration Gram-positives comme plusieurs espèces de Streptococcus, Gemella et actinomyces (Aas et al., 2005; Papaioannou et al., 2009). Chez les enfants, le profil microbien des plaques supragingivale et subgingivale est généralement identique (Papaioannou et al., 2009).

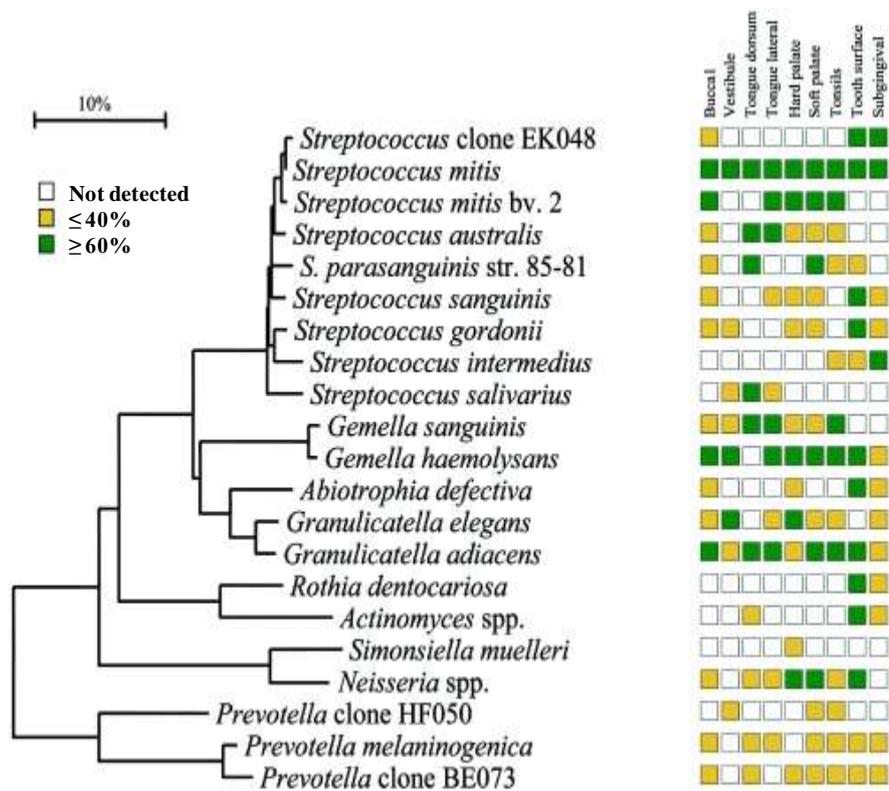
Les surfaces des dents elles-mêmes sont colonisées par des populations microbiennes diverses en fonction des différents stades de dentition. Les premières dents d'un enfant hébergent de plus fortes proportions de Proteobacteria (Gammaproteobacteria, Moraxellaceae) que de Bacteroidetes, en revanche les autres stades se caractérisent par une forte proportion de Bacteroidetes (Crielaard et al., 2011). Chez l'adulte, les dents abritent plusieurs espèces de Streptococcus (*S. sanguinis*, *S. gordonii*), *Rothia dentocariosa*, *G. hemolysans*, *G. adiacens*, espèces Actinomycètes et *Abiotrophia defectiva* (Aas et al., 2005).

#### ***b. Surfaces des muqueuses***

La muqueuse des différents sites de la cavité buccale est colonisée elle aussi par une communauté microbienne très diverse dans le temps et dans l'espace (Aas et al., 2005). Les streptocoques constituent la plus haute proportion du microbiote dans ces sites, avec une prédominance de *S. oralis* et *S. sanguis*. L'épithélium buccal est composé des espèces

*Streptococcus mitis*, *S. mitis biovar 2* et *Gemella hemolysans*, alors que au niveau des amygdales les espèces prédominants sont ; *Prevotella*, *Porphyromonas spp* et des espèces de *Firmicutes* (Aas et al., 2005).

Sur la langue, une forte densité (100 CFU/cellule épithéliale) et diversité bactérienne est observée (Theilade et al., 1990). La plupart des études réalisées sur le microbiote de la langue montrent que les *Streptococcus spp* (*S. salivarius* et *S. mitis*) et *Veillonella ssp* (*Veillonella dispar* et *Veillonella atypica*) sont les membres les plus dominants (Aas et al., 2005; Riggio et al., 2007). Accompagnés d'autres espèces majoritaires comme *Peptostreptococcus spp* à coloration Gram-positive (principalement *Actinomyces spp.*), *Bacteriondetes spp.*, et d'autres espèces à coloration Gram négative. Le profil bactérien des surfaces de la langue (latérale et dorsale) est différent en fonction de l'anatomie de celle-ci, par exemple *S. mitis biovar 2* est prédominante sur la surface latérale mais totalement absente à la surface dorsale, inversement, *S. parasanguinis* est présente sur la surface dorsale mais non détectée sur la surface latérale (Aas et al., 2005). Les micro-organismes observés au niveau de la salive dérivent principalement des bactéries qui colonisent les différents sites de la bouche. La composition de la salive est différente en fonction de l'âge et des stades de dentition ; la salive d'un enfant contient de fortes proportions de Firmicutes et d'Actinobacteria et de faible proportion de Bacteriodetes, Fusobacteria, TM7 et des spirochaetes. La famille des Veillonellaceae et le genre *Prevotella* augmente avec l'âge ce qui reflète la maturation du microbiote (Aas et al., 2005). Chez l'adulte, la composition de la salive est similaire à celle de la surface dorsale de la langue avec une prédominance de *Prevotella melaninogenica* et *S. salivarius* (Papaioannou et al., 2009). Quant à la maxillaire antérieur du vestibule, en comparaison à d'autres sites de la cavité buccale, elle possède une faible diversité microbienne, et est composée essentiellement de *S. mitis*, *Granulicatella spp.*, et *Gemella spp*. L'ensemble de ces études montrent que le microbiote buccal est diversifié selon l'âge et les différents compartiments de la bouche (**Figure 2**).



**Figure 2 : Espèces bactériennes dominantes au niveau différents sites de la cavité buccale (Aas et al., 2005)**

Le microbiote oral est influencé par divers facteurs tels que : la température, le pH, le potentiel oxydo-réduction, la disponibilité des nutriments, l'anatomie des structures orales, le flux salivaire et les substances anti-microbiennes.

La composition peut être modifiée par des facteurs dépendants des conditions environnementales : contamination par des pathogènes ou le climat, ou par des facteurs dépendant de l'hôte comme l'hygiène et les pathologies buccales (Hopkins and Macfarlane, 2002; Riggio et al., 2007).

### 1.2.2. Composition du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal, considéré aujourd'hui comme organe à part entière acquis après la naissance, est composé d'une communauté de micro-organismes dense et complexe dont le nombre est estimé entre 10 et 100 trillions d'individus (Xu and Gordon, 2003). Ce microbiote est majoritairement représenté par des bactéries (99%) et sa masse est approximativement 1kg. A cela s'ajoute la présence d'eucaryotes unicellulaires comme les levures et les protozoaires ainsi que des virus et des archées (Eckburg et al., 2005). La population bactérienne intestinale d'un individu est un univers extrêmement riche et diversifié, composé entre 1000 et 1500 espèces différentes qui constituent un écosystème

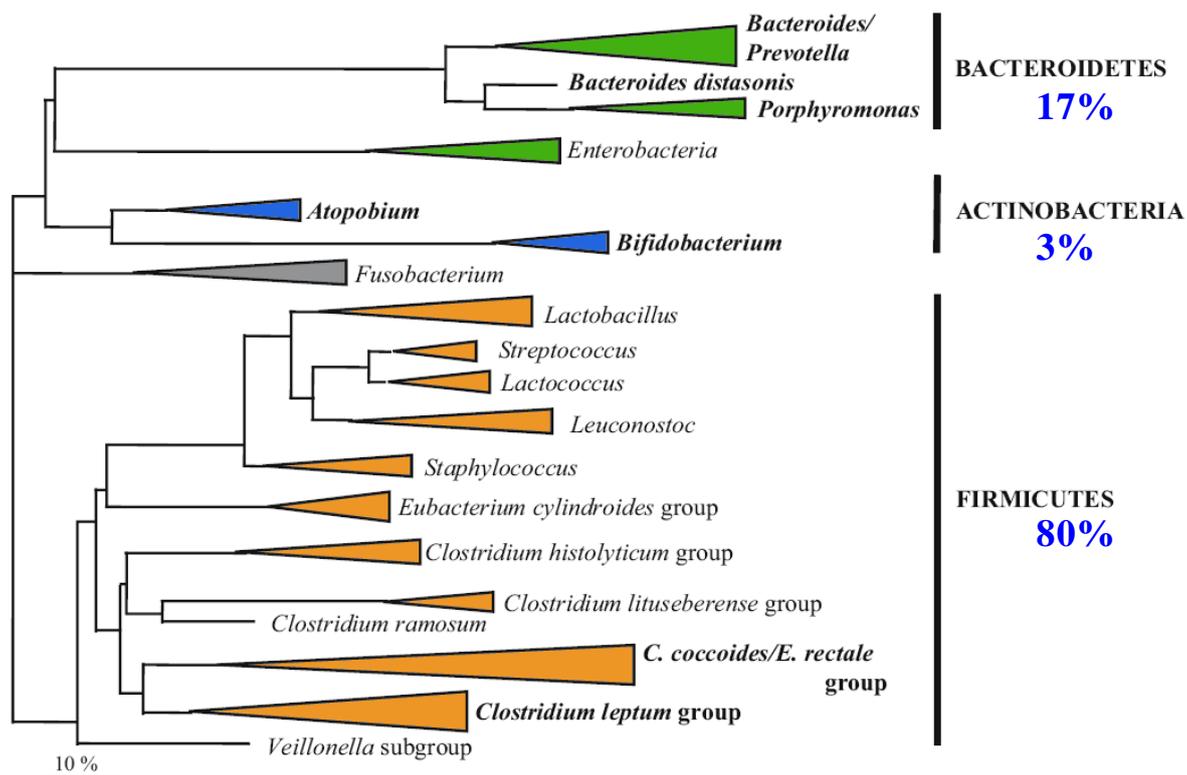
microbien dynamique. La charge de cette population chez un adulte sain est estimée à  $10^{13}$ - $10^{14}$  micro-organismes, soit dix fois plus que le nombre de cellules eucaryotes constituant le corps humain.

L'utilisation d'outils moléculaires, en particulier le séquençage massif de génomes de milliers d'espèces bactériennes habitant l'individu a permis de décrypter en partie le métagénome intestinal humain. Le séquençage par la technique Illumina<sup>2</sup> du métagénome d'échantillons fécaux d'une cohorte de 124 adultes européens et l'assemblage des différentes séquences génomiques obtenues a permis de caractériser un catalogue de 3.3 millions de gènes non redondant du microbiote intestinal humain. Ce set de gène collectif des communautés microbiennes qu'on héberge représente approximativement 150 fois le génome humain complet (Qin et al., 2010).

L'analyse de la composition de ce microbiote intestinal en taxa (genres bactériens et/ou grand groupes phylogénétiques) fait ressortir l'existence de composantes récurrentes, retrouvées chez tous les individus. Trois phyla bactériens ; Firmicutes, Bacteroidetes et Actinobacteria, rassemblent la plus grande part des bactéries intestinales dominantes (**Figure 3**). Le *phylum* des Firmicutes (bactéries à coloration Gram positif) est toujours le plus fortement représenté, réunissant environ 79% des espèces commensales. Il comprend le groupe des « *Clostridium coccoïdes* », composé d'espèces des genres Eubacterium, Clostridium, Ruminococcus. Il comprend également le groupe des « Clostridium leptum », avec notamment les espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*. Les deux autres *phyla* majoritaires sont Bacteroidetes et Actinobacteria qui représentent respectivement 17% et 3% de l'écosystème intestinal (Lay et al., 2005; Tap et al., 2009). Les Bacteroidetes partagent la dominance avec les Firmicutes et sont représentés par les genres apparentés à *Bacteroides* (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*). Enfin, les autres *phyla* rencontrés sont principalement ceux des *Proteobacteria* et *Verrucomicrobia* qui ne représentent que quelques pourcents de la population bactérienne totale.

---

<sup>2</sup> Illumina : Méthode de séquençage haut débit (ngs : new generating sequence)



**Figure 3 : Arbre phylogénétique des principaux groupes bactériens peuplant le tractus digestif humain (Blaut, M. et al., 2002)**

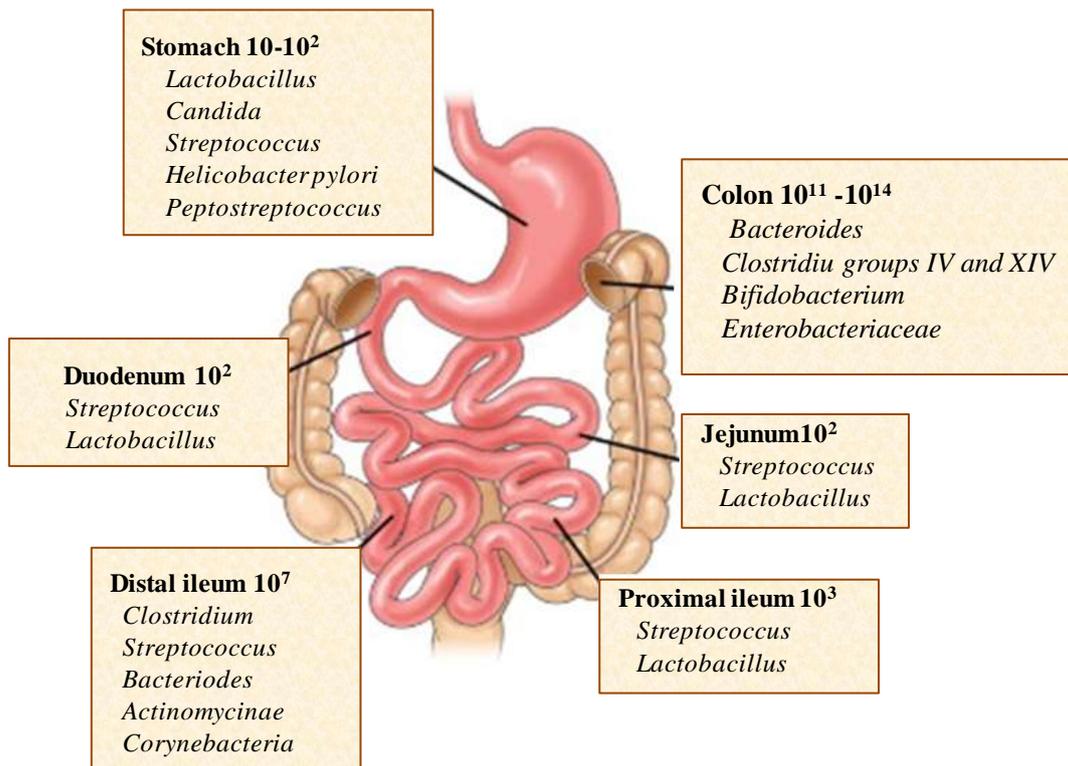
La composition du microbiote intestinal humain, bien que très conservée au niveau des *phyla* et des grands groupes bactériens, la plus grande partie (2/3 environ) des espèces dominantes sont spécifiques et propres à chaque individu (Eckburg et al., 2005). Néanmoins, un petit nombre d'espèces pourrait constituer un cœur phylogénétique est partagé par la plus part des individus (Tap et al., 2009). De même, une étude faite sur le métagénome intestinal humain a montré la présence d'un core génome commun à l'ensemble des individus de la cohorte. Ce core génome est représenté par 57 espèces bactériennes présentes chez 90% des individus (Qin et al., 2010). Ces observations expliquent que même si chaque individu vit avec un profil microbien unique et une diversité d'espèces commensales immense, il existe un groupe restreint d'espèces partagées par la plupart des individus et qui assure probablement la majeure partie des principales fonctions du microbiote. L'analyse de séquences métagénomiques a permis d'identifier trois clusters d'individus appelés Entérotypes qui ne sont spécifiques ni du continent ni de la nation d'origine (Arumugam et al., 2011).

Le profil des espèces dominantes du microbiote intestinal semble stable dans le temps (quelques jours à plusieurs années) pour un individu donné (Zoetendal et al., 1998). Néanmoins, de nombreuses perturbations comme : un changement de régime alimentaire, un état de stress (maladie, antibiothérapie, chimiothérapie) ou encore le climat et l'hygiène

individuelle sont susceptibles de modifier, au moins partiellement, l'équilibre de l'écosystème intestinal. Ceci conduit ainsi à une modification transitoire des équilibres microbiens. Cependant, le microbiote est capable de retourner au profil initial d'espèces dominantes, même après un stress majeur qui l'a modifié profondément (De La Cochetiere et al., 2005; Jakobsson et al., 2010; Jernberg et al., 2007). Cette aptitude de la résilience, suggère une adaptation très forte du microbiote à l'intestin, de l'hôte qui l'héberge.

### I.3. Répartition du microbiote digestif

La répartition et la distribution du microbiote n'est pas homogène le long du tube digestif puisque d'un segment à l'autre de ce dernier, la concentration et la diversité bactérienne différent. Les principaux facteurs à l'origine de cette répartition non homogène de ce microbiote sont : le pH qui augmente et la teneur en oxygène qui diminue le long du tube digestif, la vitesse de transit et le pouvoir d'adhésion des bactéries, la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales, la disponibilité des nutriments, en fin la compétition entre les différentes bactéries composant l'écosystème intestinal (**Figure 4**).



**Figure 4 : Densité bactérienne dans les différents compartiments du tube digestif (Sartor RB, Gastroenterology 2008)**

D'une façon générale, la densité et la complexité microbienne augmentent progressivement de la partie proximale du tube digestif vers sa partie distale formant ainsi un gradient croissant de micro-organismes (O'Hara and Shanahan, 2006). Dans l'estomac

caractérisée par des pH acides (environ 2), la présence du microbiote est quasi inexistant (inférieur à  $10^2$  UFC/g). Dans l'intestin grêle, du fait des sécrétions biliaires et pancréatiques ainsi que le péristaltisme intestinal favorisant un transit rapide, la population bactérienne est relativement faible. On observe une variation quantitative (duodénum  $10^2$  UFC/g, jéjunum/iléon :  $10^2$ - $10^7$  UFC/g) et qualitative puisqu'il y a une diminution progressive des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies facultatives telles que des lactobacilles, des streptocoques ou encore des entérobactéries.

Enfin, la densité bactérienne atteint son maximale dans le côlon. Cette partie du tube digestif caractérisée par un transit fortement ralenti, favorise l'établissement d'une communauté extrêmement riche et diversifiée de  $10^{14}$  bactéries par gramme de contenu (Suau, 2003). Le côlon est un véritable écosystème avec une population microbienne dense et dynamique, essentiellement anaérobie stricte. Le microbiote colique est représenté principalement par des *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Eubacterium*.

## II. Grandes fonctions du microbiote du tractus digestif

L'homme vit en symbiose avec une population microbienne qui colonise son tractus digestif tout au long de sa vie. Les liens fonctionnels qui unissent l'organisme humain et les micro-organismes qu'il héberge sont le fruit d'une longue coévolution (Peterson et al., 2007; Schell et al., 2002; Xu and Gordon, 2003; Xu, 2007). Cette association est considérée comme un mutualisme où les deux partenaires sont utiles l'un pour l'autre. En échange de l'habitat et de l'apport énergétique que fournit l'organisme, les bactéries commensales sont responsables de nombreuses fonctions essentielles pour le maintien de l'homéostasie<sup>3</sup> intestinale et la santé de l'hôte (Hooper et al., 2001).

### II.1. Métabolisme microbien et rôle nutritionnel

Le microbiote intestinal assure essentiellement la fermentation des différents substrats disponibles au niveau du côlon comme les glucides, protéines et les fibres d'origine alimentaire, non digérées dans la partie supérieure du tractus digestif. Il existe également des substrats d'origine endogène, représentés par l'ensemble des sécrétions de la muqueuse épithéliale intestinale comme : des mucopolysaccharides, des débris cellulaires, des enzymes et des stérols.

---

<sup>3</sup> L'homéostasie est la capacité d'un système quelconque (ici le tube digestif) à conserver son équilibre de fonctionnement et ses paramètres physiologiques en dépit des contraintes extérieures.

Les processus du métabolisme et de fermentation de ces différents composés (glucides, protéines, lipides et de nombreux micro-constituants) sont assurés par un panel extraordinaire d'activités enzymatiques portées par le microbiote de l'intestin. La dégradation des polymères glucidiques nécessite l'intervention d'une grande variété d'hydrolases, enzymes non produites par l'hôte. Les principales espèces bactériennes possédant ces activités hydrolytiques, appartiennent aux genres *Bacteriodes*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* ainsi qu'à quelques espèces des genres *Enterococcus* (Cummings and Macfarlane, 1997). Une partie des métabolites générés, permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leurs fonctionnement mais une grande partie, notamment les acides gras à chaînes courtes (AGCC) comme l'acétate, propionate et le butyrate sont rapidement absorbés au niveau de l'épithélium intestinal et métabolisés dans les différents organes (épithélium colique, foie, muscles, cœur etc). La dégradation des protéines est assurée par des bactéries protéolytiques appartenant aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* (Macfarlane et al., 1986). A l'opposé de la fermentation des glucides, la dégradation des protéines dans le côlon génère de nombreux métabolites potentiellement toxiques pour l'hôte (phénols, indoles, ammoniacque, amine). A cela, s'ajoutent les lipides bactériens et ceux provenant de la desquamation des colomocytes. Ces lipides subissent de multiples transformations (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation, etc...) par de nombreuses espèces bactériennes possédant des lipases permettant d'hydrolyser en particulier les triglycérides à chaînes longues (Juste, 2005). En fin, le microbiote produit également certaines vitamines (B8, B9 et K) (Hold et al., 2002).

Des études comparatives *in vivo* menés chez des rongeurs ont démontré que les bactéries commensales présentes chez les animaux conventionnels augmentent l'absorption des glucides et des lipides à partir de la lumière intestinale par rapport à des animaux axéniques<sup>4</sup> (Backhed et al., 2005; Sonnenburg et al., 2005). Egalement, une étude a montré que le microbiote intestinal contribue au stockage des graisses par deux mécanismes. D'une part, par l'augmentation de l'absorption de monosaccharides suivie de l'induction de la lipogenèse hépatique. D'autre part, par inhibition sélective de la protéine Fiaf (fasting-induced adipocyte factor) répresseur de la LPL (lipoprotéine lipase), le microbiote conduit à une activité LPL plus élevée, ce qui a pour conséquence une augmentation du stockage des triglycérides dans les adipocytes (Backhed et al., 2005).

---

<sup>4</sup> Les animaux axéniques sont des animaux dépourvus de microbiote ; nés et élevés dans des conditions stériles

Par ailleurs, il a été observé que les souris obèses (ob/ob)<sup>5</sup> présentaient une proportion plus importante du phylum des *Firmicutes*, associée à une réduction de 50% du genre *Bacteroides* (Ley et al., 2005). De plus, le transfert de microbiote de souris obèses à des souris axéniques induit une récupération d'énergie de l'aliment supérieure à celle induite par un transfert du microbiote de souris maigres (Turnbaugh et al., 2006). Une étude récente réalisée chez les hommes a montré qu'une modification de la charge nutritive conduit rapidement à des changements dans la composition du microbiote intestinal (Jumpertz et al., 2011). Ces changements tels qu'une augmentation de 20% de Firmicutes et une augmentation des Bacteroidetes ont été directement corrélés avec la perte d'énergie chez les sujets maigres et à une augmentation dans la récolte d'énergie. Ces observations suggèrent un rôle possible du microbiote intestinal humain dans la régulation de l'absorption des nutriments.

Récemment, une étude menée par Clément K. (UPMC) en collaboration avec des équipes de notre unité a montré des modifications du profil microbien (rapport Firmicutes/Bacteroidetes) des sujets obèses après une perte de poids suite un régime hypocalorique ou une intervention chirurgicale le by-pass. Ce rapport Firmicutes/Bactériodetes paraît donc être l'élément clé en relation avec l'obésité, sans pouvoir encore conclure s'il est une cause ou une conséquence de la prise de poids.

Ces données et ces observations récentes suggèrent l'existence potentielle d'une relation étroite entre l'équilibre du microbiote humain et l'obésité. De plus, une comparaison des métagénomés des individus obèses *versus* individus témoins a permis de constater clairement un état de dysbiose du microbiote chez les sujets obèses. Elle a permis aussi d'identifier les espèces bactériennes associées à cette pathologie, sans pour le moment comprendre si cet état de dysbiose en est une des causes ou une conséquence.

Enfin, il existe quelques effets néfastes du métabolisme bactérien en particulier, le métabolisme des xénobiotiques<sup>6</sup>. Le microbiote ralentit l'élimination de ces composés suite à la présence d'enzymes bactériennes (ex ;  $\beta$ -glucuronidase) qui dégradent ces composées en molécules cancérigènes difficilement éliminées par l'organisme (Bjorkholm et al., 2009).

---

<sup>5</sup> Les souris ob/ob sont déficientes pour le gène de la leptine, une hormone qui régule les réserves de graisses chez l'organisme

<sup>6</sup> En toxicologie, un xénobiotique est une substance chimique étrangère à l'organisme qui peut causer des trouble plus au moins important. Ce sont des polluants, des contaminants et des résidus de produits agrochimiques et vétérinaires.

## II.2. Protection contre les micro-organismes néfastes

### I.1.1. Au niveau buccal

Le microbiote autochtone exerce un antagonisme vis-à-vis des bactéries en transit avec le bol alimentaire, assurant ainsi une protection assez efficace contre les agents pathogènes (van der Waaij et al., 1971).

Les interactions et la compétition microbienne sont les principales fonctions responsables du maintien et de la régulation du microbiote buccal. Elles sont à la base des mécanismes par lesquels la population microbienne s'oppose à l'implantation des micro-organismes allochtones. En effet, la compétition pour les récepteurs d'adhésion, pour les nutriments et la production d'antagonistes sont des mécanismes qui contribuent à la stabilité de l'écosystème buccal.

De plus, les bactéries commensales produisent certaines substances comme des acides gras à chaîne courte (AGCC), du peroxyde d'hydrogène, des substances microbiennes et des enzymes qui limitent la croissance et la prolifération des bactéries indésirables. La production par *Streptococcus salivarius* de l'uréase, enzyme dégradant, l'urée contribue à la stabilité des communautés microbiennes buccale (Chen et al., 1996; Sissons and Yakub, 2000). De même, la production par cette bactérie d'une autre enzyme fructanase (FruA), module la colonisation de la surface buccale par *Streptococcus mutans* en dégradant les composés impliqués dans la formation des biofilms (Ogawa et al., 2011).

L'acide lactique sécrété par *S. mutans* et les *Lactobacilles* génère des pH bas conduisant à un effet bactéricide inhibant la croissance de *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* et un grand nombre de bactéries à coloration Gram-négative (Parrot et al., 1989). Enfin, les différents types de bactériocines et du peroxyde d'hydrogène produits par les streptocoques oraux, ont un large spectre d'activité sur les bactéries à coloration Gram-positif (Jack et al., 1995)

### II.2.1. Au niveau intestinal

Le microbiote intestinal exerce une forte activité contre les micro-organismes qui transitent avec l'alimentation assurant ainsi une protection efficace pour son hôte. Les divers mécanismes formant la première ligne de défense de l'hôte sont essentiellement : résistance à la colonisation, exclusion compétitive ou effet barrière en empêchant leur translocation dans la circulation sanguine. Les propriétés d'adhésion des bactéries commensales à la muqueuse intestinale permettent de les maintenir en place en quantité importante pendant toute la vie de l'individu et inhibent la colonisation de l'intestin par d'autres bactéries. De plus, les bactéries

du microbiote induisent l'expression et la sécrétion au niveau mucoale des peptides à activité anti-bactériennes (AMPs). Ces derniers regroupent les défensines, les lysozymes et cathelicidines sont capables de limiter la prolifération ou la synthèse de toxines par des bactéries pathogènes (Ayabe et al., 2000; Lai and Gallo, 2009). Egalement, certains composants membranaires bactériens, notamment l'acide lipotéichoïque, induisent un renforcement des jonctions serrées au niveau de l'épithélium intestinal, ce qui limite le passage des pathogènes dans la circulation sanguine (Cario et al., 2004). La présence du microbiote intestinal est un élément essentiel pour le maintien de la barrière et l'homéostasie intestinale (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

### **II.3. Physiologie intestinale et développement du tube digestif**

Le rôle des bactéries commensales dans le développement morphologique de l'intestin a été mis en évidence grâce aux études comparatives de souris axéniques *versus* conventionnelles. De nombreuses différences ont été observées : les animaux axéniques présentent une vascularisation de l'intestin plus faible, des activités enzymatiques digestives réduites, ainsi qu'une couche de mucus plus importante. Ces animaux présentent une sensibilité aux infections plus importantes et un besoin calorique supérieur de 20 à 30% par rapport à des animaux conventionnels (Shanahan, 2002). De plus, le microbiote accélère le renouvellement de l'épithélium colique en augmentant la prolifération des cellules souches. En absence de microbiote, la vitesse de production des cellules par les cryptes est réduite et peut aboutir à une différence de production quotidienne d'environ 50 cellules équivalent à une diminution d'environ 20% du nombre de cellules par crypte (Alam et al., 1994).

Une étude menée à l'aide de souris initialement axéniques, a permis de mettre en évidence l'importance du microbiote dans l'angiogénèse<sup>7</sup> intestinale (Stappenbeck et al., 2002). La comparaison des réseaux de vaisseaux sanguins et des villosités intestinales de souris adultes axéniques et conventionnelles a montré que ce réseau est deux fois moins dense chez des souris axéniques en raison d'un développement stoppé de façon précoce chez ces dernières. Il a été également observé que l'histologie intestinale des animaux axéniques est très différente : les villosités duodénales sont plus longues, celles de l'iléon plus courtes et la longueur des microvillosités est diminuée.

### **II.4. Education du système immunitaire**

Les bactéries commensales jouent un rôle essentiel dans le développement et la maturation du système immunitaire de leur hôte. D'une part, elles sont une source d'antigènes

---

<sup>7</sup> Processus de formation des vaisseaux sanguins

capable de déclencher la réponse immunitaire spécifique systémique et locale. D'autre part, elles influencent le nombre et la distribution des populations cellulaires du système immunitaire et jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire.

De nos jours, la majorité des études décrivant le rôle crucial du microbiote dans l'éducation du système immunitaire ont été majoritairement menées sur le microbiote intestinal. Peu d'études ont été réalisées sur l'implication du microbiote buccal dans cette fonction.

#### **II.4.1. Au niveau buccal**

Le microbiote oral exerce un rôle important dans le développement et l'activation du système immunitaire oral, et notamment dans la production des IgAs sécrétoires (Cole et al., 1985, (Wirth et al., 2008). Il influence le développement de la réponse immunitaire innée contre les bactéries pathogènes (Collier-Hyams et al., 2005).

La stimulation permanente du système immunitaire par le microbiote oral est en fait nécessaire non seulement pour son développement mais également pour le maintien de l'homéostasie orale, de la barrière épithéliale ou encore de l'équilibre entre la réponse pro et anti-inflammatoire. Le contact des micro-organismes conduit les cellules épithéliales à produire une variété de cytokines antimicrobiennes, comme les défensines (Bohn et al., 1998; Boyaka et al., 1999, {Bohn, 1998 #1310). Ces peptides sécrétés aussi par les neutrophiles et les macrophages sont importants pour la défense innée pour une large gamme d'espèces (Yang et al., 1999).

#### **II.4.2. Au niveau intestinal**

Des études menées chez des enfants, ont montré que l'acquisition et la mise en place séquentielle du microbiote jouent un rôle crucial dans le développement et la maturation du système immunitaire ainsi que sur l'équilibre des populations lymphocytaires (Th1, Th2 et cellules T régulateur (Treg)) (Adlerberth and Wold, 2009; Round and Mazmanian, 2009; Round and Mazmanian, 2010). De même, un retard dans la colonisation du tube digestif d'un nouveau-né pourrait aboutir à des anomalies de maturation du système immunitaire et favoriserait ainsi l'incidence des pathologies auto-immunes et allergiques.

Des études comparatives entre les souris axéniques et leurs homologues conventionnelles ont démontré clairement le rôle essentiel joué par le microbiote dans le développement et la maturation du système immunitaire et ses fonctions. En effet, les animaux axéniques présentent de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire

intestinal : hypoplasie<sup>8</sup> des plaques de Peyer, diminution du nombre de cellules CD8<sup>+</sup> présentant un TCR $\alpha\beta$  (T cell receptor) et de lymphocytes CD4<sup>+</sup> producteurs des cytokines au sein de la *lamina propria* intestinale (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Niess et al., 2008). Une diminution des concentrations d'immunoglobulines sériques (IgA), des cytokines (O'Hara and Shanahan, 2006) et des lymphocytes Treg (producteurs d'IL-10 et de TGF $\beta$ ) dans les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer a été observé chez les souris axéniques (Ishikawa et al., 2008). Les bactéries commensales favorisent aussi le développement de sous populations lymphocytaires. Elles permettent la communication isotopique des cellules B humaines (He et al., 2007), le développement de cellules Th17 effectrices (Ivanov et al., 2008) et limite la production de Treg au niveau intestinal (Hall et al., 2008).

Les anomalies observées ne se limitent cependant pas à l'épithélium intestinal puisque la rate et les ganglions lymphatiques des animaux axéniques ne sont pas structurés et présentent des zones lymphocytaires atrophiées (Macpherson and Harris, 2004; Smith et al., 2007). Ces anomalies peuvent être corrigées par inoculation d'un microbiote de souris conventionnelles à ces souris axéniques. Certains mécanismes mis en jeu ont été établis. Il a été montré que le polysaccharide A (PSA) purifié de la bactérie commensale *Bacteroides fragilis*, une des espèces bactériennes dominantes chez la souris naïve était capable de rétablir la maturation du système immunitaire de souris axéniques (Mazmanian et al., 2005). Des travaux similaires ont montré que la colonisation des souris sans microbiote avec un cocktail de souches de *Clostridium* induit et stimule les cellules T régulatrices de la *lamina propria* (Atarashi et al., 2011). Il a été montré que chez les souris gnotobiotiques seules certaines bactéries dont les bactéries filamenteuses segmentées (Filamentous Segment Bacteria) participent à la maturation du système immunitaire intestinal. Ces observations suggèrent que le rôle du microbiote dans l'éducation du système immunitaire est limité à un nombre restreint de bactéries commensales (Gaboriau-Routhiau et al., 2009).

Enfin, le microbiote participe à l'éducation du système immunitaire mucosal et à la mise en place de la tolérance orale en participant notamment à la mise au blocage des réponses immunitaires cellulaires et humorales<sup>9</sup> dirigées contre les antigènes alimentaires ingérés (Sudo et al., 1997).

## II.5. Autres fonctions du microbiote

A ces quatre fonctions principales du microbiote se rajoutent d'autres effets bénéfiques mis en évidence ces dernières années, en particulier le lien entre le microbiote et la

---

<sup>8</sup> Hypoplasie est un terme créé par Virchow en 1870 pour désigner un arrêt ou un insuffisant du développement d'un tissu ou d'un organe

<sup>9</sup> La réponse immunitaire humorale correspond à la production d'anticorps par les lymphocytes B.

communication avec le système nerveux central (SNC). Les études comparatives de souris axéniques et des souris conventionnelles ont démontré le rôle complexe des bactéries commensales dans le développement et la fonction du SNC. En effet, en absence du microbiote, le développement de la conduite basale des souris est fortement diminué, ce qui se traduit par une augmentation de l'anxiété et du stress des souris. Ces comportements s'accompagnent par des changements de certaines neurochimines dans le cerveau comme la diminution de l'expression des récepteurs de N-méthyl-D-aspartate et de sérotonine 1A (5HT1A) ainsi que d'une augmentation de l'expression du facteur eutrophique (Neufeld et al., 2010). Egalement, une étude en 2004 a montré que la colonisation microbienne postnatale affecte le développement de la plasticité du cerveau et par conséquent la réponse des souris au stress (Sudo et al., 2004). L'étude de Heijtz en 2010 a confirmé ces observations et a démontré que les souris axéniques ont une activité locomotrice plus importante et une anxiété réduite par rapport aux souris conventionnelles (Heijtz et al., 2010). Ce phénotype de comportement est associé à l'altération de l'expression des gènes au niveau des régions du cerveau impliquées dans le contrôle de l'activité locomotrice et de l'anxiété. Les résultats de cette étude suggèrent que les processus de colonisation microbienne influent sur les mécanismes de signalisation affectant les circuits neuronaux impliqués dans l'activité locomotrice et l'anxiété.

## Chapitre II : L'épithélium digestif et son système immunitaire

### I. Epithélium digestif et l'homéostasie intestinale

#### I.1. Anatomie du tube digestif

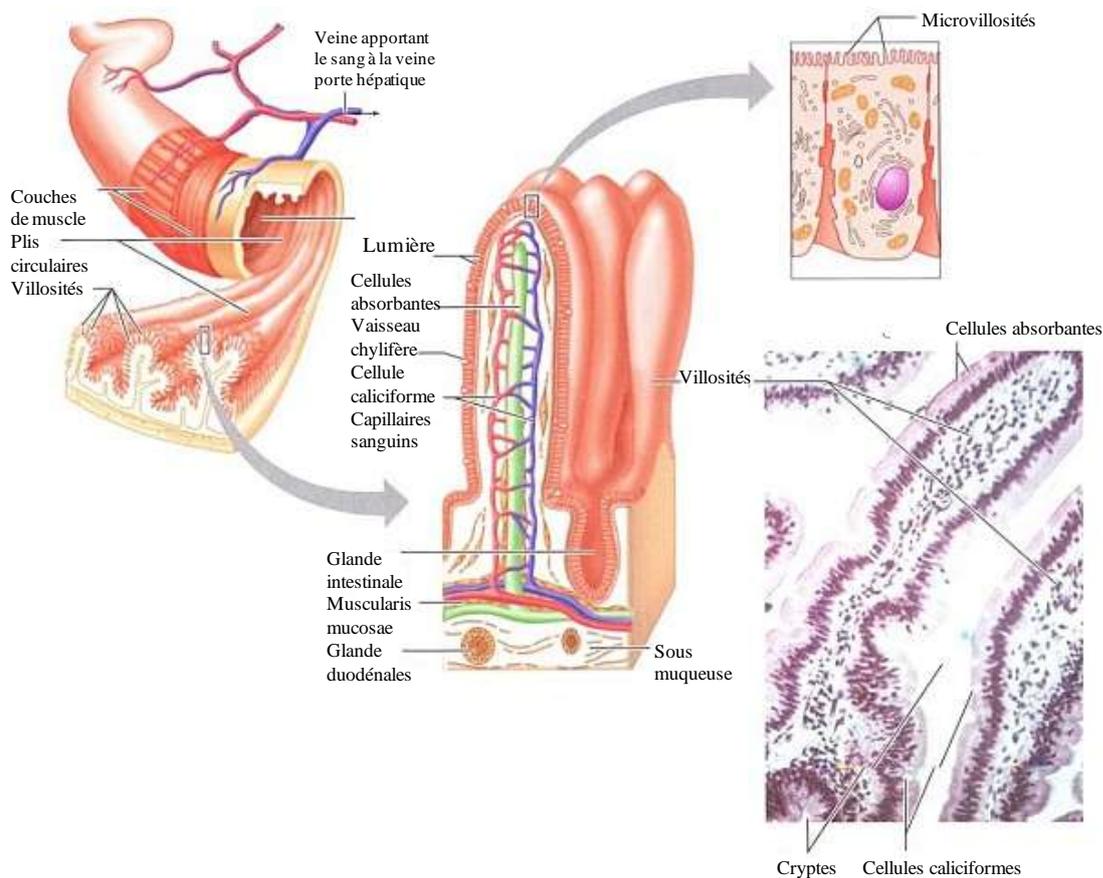
Le système digestif constitué de différents organes successifs ; la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon assurent la dégradation des aliments en éléments simples (acide aminés, acides gras, glucides simples, sels minéraux et oligo-éléments) utilisables par l'organisme. Il assure l'absorption de ces nutriments dans le milieu intérieur (le sang et la lymphe) pour être utilisés par l'organisme. Ces substances constituent les matières premières pour la fabrication, la réparation et le contrôle des différents systèmes de l'organisme.

La partie inférieure du tube digestif est composée principalement de l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle représente la partie proximale de l'intestin, faisant suite à l'estomac. Il est composé de trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le gros intestin constitue la partie distale. Il est également divisé en trois segments : le caecum, le côlon et le rectum. L'intestin grêle constitue le principale organe de digestion et d'absorption des nutriments, celui-ci est largement vascularisé afin d'optimiser les échanges entre l'organisme et l'environnement extérieur. Par sa longueur (environ 7m) et par l'organisation de sa muqueuse en différents niveau de replis, la surface initiale est multipliée d'un facteur 400 à 1500 pour un adulte, soit une surface d'échange estimée entre 200 et 300 m<sup>2</sup> (l'équivalent d'un terrain de tennis). En plus du rôle essentiel d'assurer l'absorption des nutriments, le tube digestif possède également deux autres fonctions importantes : un rôle de défense contre les agressions extérieures (bactéries pathogènes, virus et antigènes) ainsi qu'un rôle endocrinien<sup>10</sup>.

La paroi intestinale se compose de différentes tuniques cellulaires réparties de la lumière intestinale vers l'intérieur de l'organisme (**Figure 5**) : la muqueuse est constituée d'un épithélium unistratifié et d'un tissu conjonctif appelé chorion ou *lamina propria*, de la sous muqueuse, de la musculuse composée d'une première couche de tissu musculaire lisse circulaire puis d'une couche de tissu musculaire lisse longitudinale et de la séreuse.

---

<sup>10</sup> Fonction de sécrétion d'hormones.

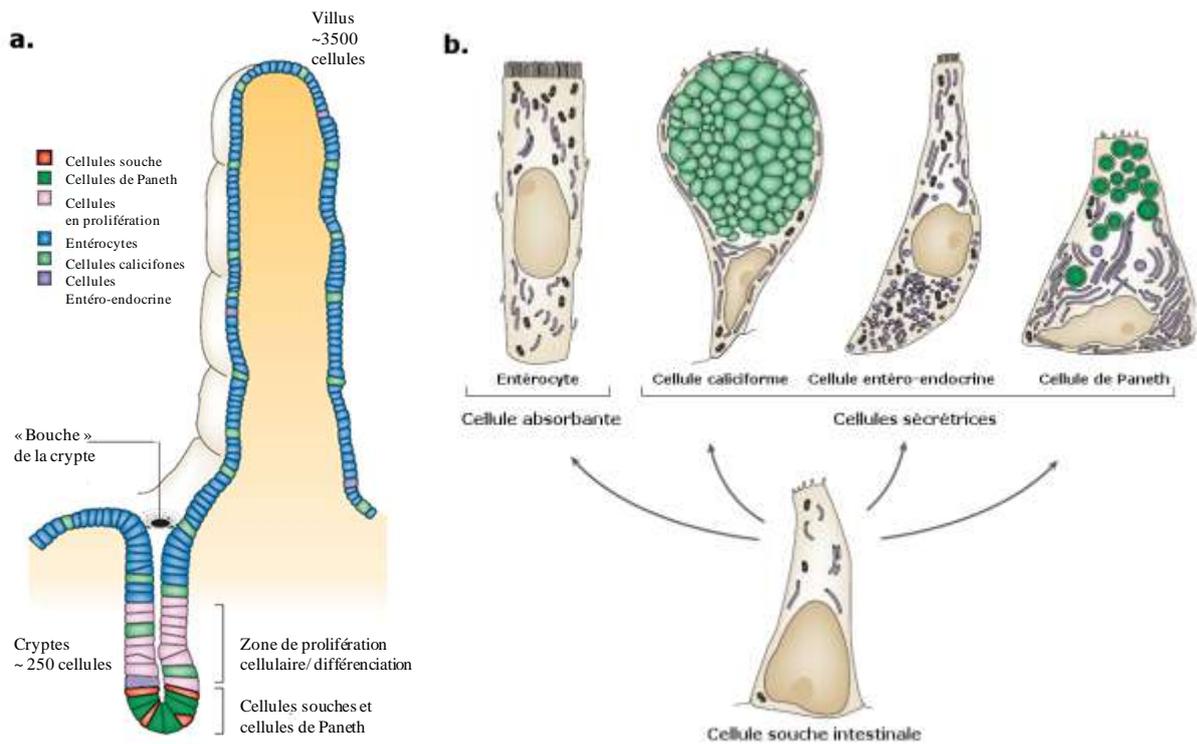


**Figure 5 : Anatomie de l'intestin (E.N. Marieb, Anatomie et physiologie humaine, Edition DeBoeck Université, 1999)**

- a. Structure générale de l'intestin grêle
- b. Représentation schématique de la structure d'une villosité
- c. Cellule absorbante ou entérocyte présentant des microvillosités au niveau apical
- d. Coupe histologique de la muqueuse de l'intestin grêle montrant les villosités (x 300)

## I.2. Epithélium intestinal

La muqueuse intestinale est une des plus grandes interfaces entre l'organisme et l'environnement extérieur. Elle est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales liées entre elles par des jonctions serrées formant ainsi une barrière physique entre le corps et le contenu luminal. La muqueuse de l'intestin grêle présente des villosités qui se projettent dans la lumière intestinale et des invaginations dans la *lamina propria* appelées cryptes (**Figure 6a**) ou glandes de Lieberkühn (Sancho et al., 2003), s'intercalant entre les villosités. Absentes au niveau de la muqueuse colique qui présente une surface lisse, les villosités assurent l'absorption des nutriments.



**Figure 6 : Représentation schématique des différents types de cellules épithéliales intestinales et leurs distributions le long de l'intestin. (modifiée d'après Crosnier et al., 2006)**

La muqueuse intestinale issues de la différenciation de cellules souches multipotentes<sup>11</sup> localisées au fond des cryptes est constituée de populations cellulaires hétérogènes avec des fonctions bien définies (**Figure 6b**) (Barker et al., 2007). Le type cellulaire représenté majoritairement (environ 80%) est constitué par des cellules épithéliales intestinales polarisées (entérocytes) présentes tout le long de l'intestin et assurant la fonction d'absorption des nutriments (Massey-Harroche, 2000). Elles présentent à leur pôle apical des microvillosités riches en enzymes de digestion comme les hydrolases et en transporteurs. Ces cellules sont liées entre elles par des jonctions serrées et forment ainsi une véritable barrière physique vis-à-vis des bactéries, virus et des molécules supérieures à 600 Da.

Les cellules calciformes (ou à gobelet) représentent 10 à 20% des cellules de l'épithélium intestinal et sont particulièrement abondantes dans le côlon. Elles sont spécialisées dans la sécrétion par exocytose dans la lumière intestinale de mucus, un revêtement protecteur des muqueuses constitué d'une matrice de glycoprotéines. Les rares cellules entéro-endocrines présentes (représentent moins de 0.5%), produisent des hormones et neurotransmetteurs comme la sérotonine, la gastrine, la substance P et la sécrétine (Hocker

<sup>11</sup> Cellule indifférenciée, capable de s'auto renouveler, de se différencier en d'autres types cellulaires et de proliférer en culture

and Wiedenmann, 1998). Ces trois types cellulaires (entérocytes, calciformes et entéro-endocrines) sont renouvelées par un mécanisme de différenciation et de migration de la crypte au sommet des villosités. Elles se détachent et sont expulsées dans la lumière intestinale par un phénomène appelé anoïkis<sup>12</sup> permettant un renouvellement assez rapide (2 à 5 jours) de l'épithélium. Enfin, les cellules de Paneth représentent 7.5% de l'épithélium de l'intestin grêle. Ce sont les seules, issues de la division de cellules souches, restant localisées à la base des cryptes et se renouvelant tous les 20 jours. Leur principale fonction est la production et la sécrétion dans la lumière des cryptes des peptides antimicrobiens tels que le lysozyme, la phospholipase A2, les  $\alpha$ - et  $\beta$ -défensines (Brandl et al., 2007; Keshav, 2006; Salzman, 2010). Le positionnement des cellules souches en contact étroit avec les cellules de Paneth suggère une protection essentielle dans cette zone de renouvellement cellulaire la plus vulnérable de l'épithélium intestinal.

Il existe d'autres types cellulaires localisés dans l'épithélium et impliqués dans la réponse immunitaire comme les cellules M (cellules *micofold*) recouvrant les plaques de Peyer ainsi que les lymphocytes intra-épithéliaux qui s'intercalent entre les entérocytes.

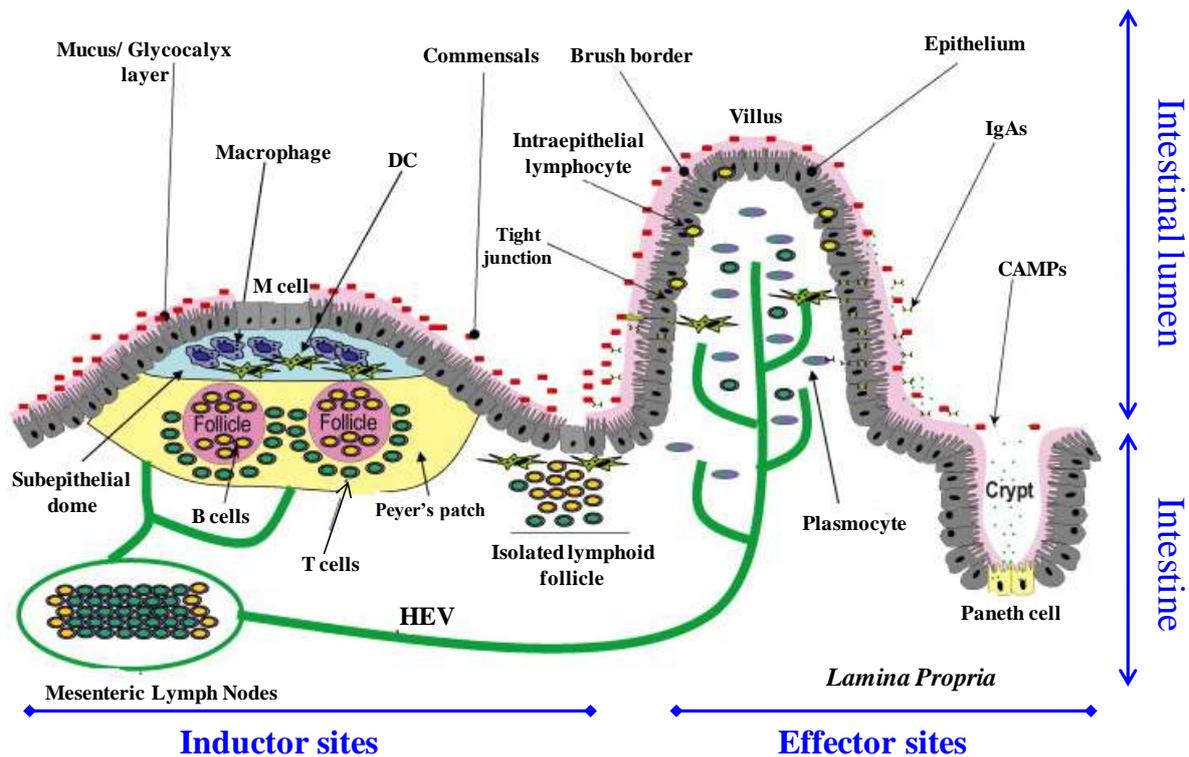
## II. Système immunitaire associé à l'intestin

Le système immunitaire associé à l'intestin (GALT : gut- associated lymphoid tissue) constitue une part importante et complexe du système immunitaire de l'organisme. Il a comme fonction cruciale de discriminer d'une façon efficace et rapide les antigènes alimentaires et le microbiote (du soi), des agents potentiellement pathogènes (non soi) et éviter leur dissémination dans l'organisme. Ce système contient la plus grande réserve de cellules immunocompétentes de l'organisme humain, à savoir 65% des cellules immunitaires et 80% des cellules productrices d'immunoglobulines (Brandtzaeg et al., 1989; Hord, 2008).

Schématiquement, le GALT s'organise en deux sites, respectivement inducteur et effecteur de la réponse immunitaire intestinale, reliés entre eux par des voies hématolymphatiques (**Figure 7**). Sa maturation et son développement post-natal dépendent du développement et de la composition du microbiote endogène et *vice versa* (Bouskra et al., 2008; Macpherson and Harris, 2004; Mazmanian et al., 2005).

---

<sup>12</sup> Il s'agit d'un mécanisme de mort cellulaire programmé (apoptose) spécifiquement induit par la perte de contact de la cellule avec la matrice extracellulaire



**Figure 7 : Représentation schématique du système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (Magalhaes, J. G. et al., 2007)**

Les tissus organisés des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques sont impliqués dans l'initiation de la réponse immune alors que les sites effecteurs sont dispersés le long de l'épithélium et de la *lamina propria* de la muqueuse intestinale. Les plaques de Peyer et *lamina propria* des villosités sont drainées par des vaisseaux lymphatiques afférents conduisant aux ganglions mésentériques.

Le site inducteur est le siège de la collecte d'antigènes luminaux et d'induction de la réponse immune. Il comprend des formations lymphoïdes hautement organisées telles que les ganglions mésentériques (MLN, mesenteric lymph nodes), les follicules lymphoïdes isolés et les plaques de Peyer. Ces dernières sont exclusivement présentes dans l'intestin grêle tandis que les follicules lymphoïdes isolés sont présents dans la *lamina propria* le long du tube digestif avec une abondance au niveau du côlon (Gordon et al., 1997).

Le site effecteur est la zone de développement de la réponse immunitaire. Il comprend les cellules épithéliales, les plasmocytes (cellules B matures) et les lymphocytes T matures disséminés le long de la muqueuse. Ces cellules exercent leur fonction immune par la production d'anticorps, de cytokines et/ou par cytotoxicité.

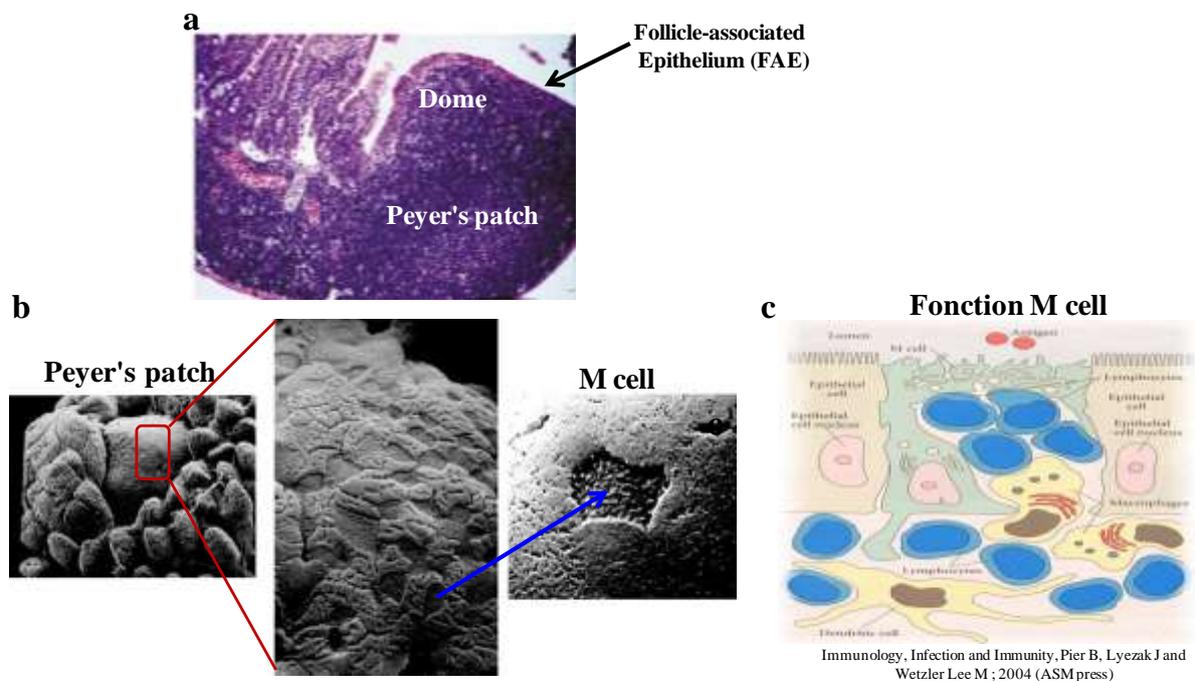
## II.1. Plaque de Peyer

Les plaques de Peyer sont les principaux constituants du GALT, ce sont des structures lymphoïdes macroscopiques spécialisées présentes dans la muqueuse et une partie de la sous muqueuse de l'intestin grêle. Une plaque de Peyer est formée d'un dôme et d'un centre

germinatif. L'ensemble est recouvert d'une monocouche de cellules épithéliales cylindriques appelée épithélium associé au follicule (FAE, follicule-associated epithelium) constitué de cellules M et d'entérocytes (**Figure 8a**).

Le dôme sépare la plaque de Peyer de l'épithélium sous-jacent et contient des lymphocytes B exprimant tous les isotypes d'immunoglobulines, des lymphocytes T, des macrophages et de différentes sous-populations de cellules dendritiques (DCs). Le centre germinatif contient les lymphocytes B immatures qui se différencient principalement en plasmocytes producteurs d'immunoglobuline A (IgA) et d'autres zones interfolliculaires peuplées de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des cellules présentatrices d'antigènes.

Enfin, le principal composant de FAE est les cellules M (microfold), un type cellulaire bien particulier qui s'intercale entre les entérocytes. Ces cellules captent les antigènes luminaux et assurent leurs transports vers le dôme (**Figure 8b**).



**Figure 8 : Histologie de plaque de Peyer au niveau de la muqueuse intestinale (Laukoetter MG et al., World Journal of Gastroenterology, 2008).**

- Plaques de Peyer formant un dôme et séparées de la lumière intestinale par l'épithélium associé au follicule FAE contenant les cellules M
- Microscopie électronique des plaques de Peyer et du FAE : Grossissement progressif de gauche à droite d'un dôme au centre parmi les villosités (gauche), cellules M dépourvues de microvillosités à leur face apicale (droite)
- Représentation schématique de la cellule M et les cellules immunitaires qu'elle héberge

Le domaine apical des cellules M, dépourvu de bordure en brosse, possède de courts micro-replis (d'où le nom cellule M) visibles en microscopie électronique. Au contraire le domaine baso-latéral forme des invaginations intra-épithéliales, sites d'hébergement d'une

sous-population de lymphocytes B et T intra-épithéliaux ainsi que des macrophages et des cellules dendritiques DC (**Figure 8c**). Les lymphocytes B et T des plaques de Payer sont renouvelés en permanence à partir du pool circulant de lymphocytes.

## II.2. Ganglions mésentériques

Les ganglions mésentériques organisés au niveau du tissu conjonctif du mésentère intestinal sont drainés par des vaisseaux lymphatiques afférents de l'épithélium et de la *lamina propria* de l'intestin grêle et du côlon. Ces ganglions sont constitués d'un cortex contenant des lymphocytes B organisés en follicules lymphoïdes et d'une zone para-corticale ou medulla hébergeant les lymphocytes T et les DC. Les vaisseaux lymphatiques efférents quittent ainsi le ganglion au niveau de la medulla et drainent la lymphe jusqu'au canal thoracique avant de rejoindre la circulation systémique.

Le recrutement des lymphocytes T effecteurs dans la zone para-corticale des ganglions mésentériques se fait au niveau des veinules post-capillaires. Le récepteur aux chimiokines CCR9 et les molécules d'adhésion (intégrine  $\alpha4\beta7$ ) exprimés à la surface de ces lymphocytes sont capables de se fixer à Mad-CAM1 exprimées sur les cellules endothéliales (Berlin et al., 1995; Berlin et al., 1993). Cette fixation permet l'adhésion des lymphocytes à la paroi des vaisseaux et leur migration dans les tissus sous-jacents. L'expression de ces deux molécules (intégrine  $\alpha4\beta7$  et CCR9) dépend de la présence d'acide rétinoïque et des cellules stromales des ganglions mésentériques (Gorfu et al., 2009; Hammerschmidt et al., 2008). Récemment, il a été montré chez les rats que l'ablation des ganglions mésentériques augmente la réponse IgA vis-à-vis d'antigènes oraux, ce qui suggère un rôle important de ces organes lymphoïdes dans la régulation des réponses humorales (Hahn et al., 2010).

## III. Stratégies de protection mucosale

Notre environnement est peuplé de nombreux micro-organismes susceptibles d'agresser leur hôte et d'induire des pathologies. Notre organisme doit mettre en place et développer des réponses immunitaires appropriées afin de se protéger des infections. Le système immunitaire intestinal est l'objet d'une régulation complexe. Il possède une double fonction : une fonction de défense anti-infectieuse visant à détruire les pathogènes et une fonction de tolérance vis-à-vis des milliers d'antigènes alimentaires et des bactéries commensales. Les réponses immunes protectrices sont assurées par l'action coordonnée des systèmes immunitaires inné et adaptatif. En plus de ces réponses, la muqueuse intestinale constitue une principale interface avec le milieu extérieur et assure une première ligne de

défense. Pour préserver l'homéostasie intestinale, la muqueuse a développé plusieurs stratégies de défense afin d'empêcher l'intrusion de micro-organismes ou d'antigènes néfastes dans le compartiment systémique.

### III.1. L'épithélium intestinal, première ligne de défense

L'épithélium intestinal est en contact direct et permanent avec le contenu intraluminal et présente une véritable barrière contre les différents types d'agressions. Cette fonction est assurée par des mécanismes de défense non spécifiques comme le renouvellement rapide de l'épithélium, la présence des jonctions serrées et la sécrétion de mucus. Il présente aussi des mécanismes de défense spécifiques comme la sécrétion des peptides à activité anti-microbiennes.

#### III.1.1. Barrière épithéliale ; ligne physique

Grâce à son architecture, l'épithélium intestinal forme une première ligne de défense et de protection non spécifique contre les invasions de micro-organismes. Cette fonction barrière est assurée par deux composants structuraux : la bordure en brosse des cellules épithéliales et les jonctions serrées situées entre ces cellules (Artis, 2008).

La bordure en brosse, représentée par un réseau dense de microvillosités au pôle apical des cellules épithéliales, forme une barrière physique contre les antigènes luminaux et empêche l'adhésion et l'invasion microbienne (Dahan et al., 2007). Les jonctions serrées composées des protéines transmembranaires de la famille des zonula-occludens (ZO-1, -2 et -3), des claudines, occludines et JAM (junction associated molecule) sont situées du côté apical des cellules. Elles permettent de relier ces dernières entre elles et de les fixer solidement à la matrice extracellulaire formant ainsi une ligne perméable au niveau de l'espace intercellulaire (Madara et al., 1990).

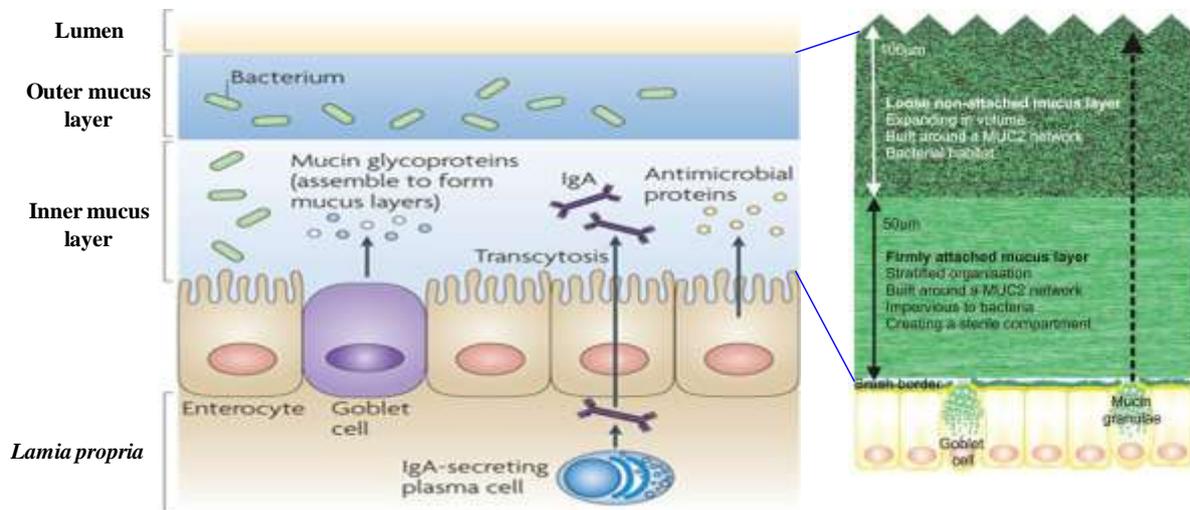
#### III.1.2. Sécrétion du mucus

Cette barrière physique est renforcée par la présence d'une couche continue de mucus sécrété et renouvelé en permanence par les cellules caliciformes et de glycocalyx<sup>13</sup> tapissant les surfaces des cellules épithéliales (**Figure 9**) (Frey et al., 1996; McAuley, 2007). Cette couche semi-perméable joue un rôle dans la réparation des tissus endommagés et accélère ainsi leur cicatrisation. Elle interagit avec les protéines membranaires des bactéries commensales (ex Lipopolysaccharide), permettant ainsi leur séquestration (Sansonetti, 2004).

---

<sup>13</sup> Le Glycocalyx est une protection de base de la membrane externe de toutes les cellules eucaryotes. Il est composé de polyholosides (polymères sucrés, acide hyaluroniques) liés de manière covalente aux lipides et aux protéines membranaires, il est très hydrophile créant ainsi un environnement aqueux autour de la cellule.

Les propriétés et l'épaisseur de la couche de mucus sont différentes selon les segments du tube digestif. Dans l'intestin grêle, le mucus forme un gel soluble et la protéine Muc2 qui le compose n'est pas ancrée à l'épithélium. En revanche, au niveau du côlon hébergeant une charge microbienne importante, l'épaisseur de mucus est plus importante (150µm). Celui-ci est structuré en deux couches. La première couche (interne) avec une épaisseur de 50µm chez la souris, présente une architecture stratifiée très compacte bloquant intégralement le contact des bactéries résidentes avec la bordure de l'épithélium. Cette couche est solidement ancrée à l'épithélium par l'intermédiaire de la protéine Muc2 qui la compose. Au-dessus se trouve une seconde couche (externe) de 100µm d'épaisseur chez la souris. Elle est issue de la précédente couche mais, elle est plus fluide et, contrairement à la première, elle abrite des bactéries (Hansson and Johansson, 2010).



**Figure 9 : Représentation schématique des différentes couches de mucus (Lora V. Hooper et al. Nature Reviews/Immunology, 2010)**

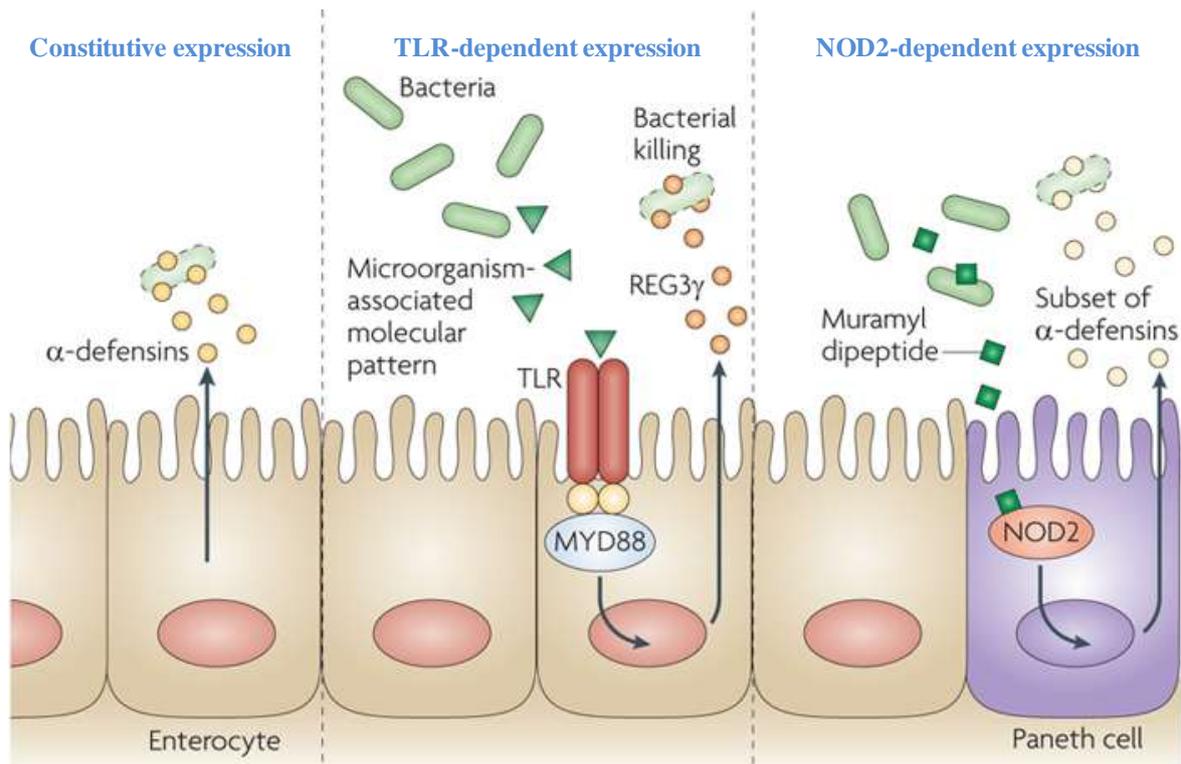
Le mucus est une glycoprotéine constituant l'une des premières lignes de défense contre les pathogènes et limitant la charge microbienne à la surface du pôle apical des cellules épithéliales

D'une manière générale, seules les bactéries possédant des mucinases et des facteurs d'adhésion et de colonisation sont capable de franchir cette ligne de défense. Ces propriétés et caractéristiques sont discriminantes entre les bactéries pathogènes et commensales (Sansonetti, 2004).

### III.1.3. Secrétions des peptides anti-microbiens

En plus d'être une barrière physique, l'épithélium intestinal sécrète des peptides anti-microbiens qui jouent un rôle important dans les mécanismes de défenses innées de l'hôte. La fonction principale de ces peptides est de réguler la charge microbienne à proximité et de limiter son contact avec les cellules épithéliales. Les peptides anti-microbiens sécrétés par les

cellules épithéliales sont les membres de la famille des défensines, cathélicidines et de C-type lectines. La plupart de ces peptides neutralisent les bactéries directement par une attaque enzymatique des parois bactériennes (lyse) ou en désorganisant la membrane intérieure de ces dernières (perméabilisations) (Artis, 2008). En plus, certains peptides antimicrobiens comme la lipocaline1, agissent en privant les bactéries de métaux lourds comme le fer, essentiels à leur croissance (Flo et al., 2004). D'une façon globale, ces peptides anti-microbiens ont un large spectre d'action, à la fois contre les bactéries à coloration Gram positive et négative.



**Figure 10 : Régulation de l'expression des peptides anti-microbiens par l'épithélium intestinal (Lora V. Hooper et al. Nature Reviews/Immunology, 2010)**

L'expression des peptides anti-microbiens par les différentes lignées de cellules épithéliales intestinales est régulée par plusieurs mécanismes distincts; certaines catégories de peptides anti-microbiens comme la plupart de la famille des défensines (α-défensines et β-défensine1) sont exprimées d'une façon constitutive, en revanche l'expression des autres catégories est contrôlée par l'activation des récepteurs de l'immunité innée (récepteurs de surface TLR et cytoplasmiques les NOD2).

Les peptides anti-microbiens sont produits pratiquement par toutes les lignées de cellules épithéliales intestinales, incluant les entérocytes, les cellules de caliciformes et les cellules Paneth. Leur expression est régulée par les mécanismes distincts (**Figure 10**). Plusieurs catégories des peptides anti-microbiens comme les défensines (α-défensines et β-défensine1) sont exprimées d'une façon constitutive et ne nécessitent pas de signaux bactériens. En revanche, l'expression de certains peptides anti-microbiens est contrôlée par l'activation des récepteurs de l'immunité innée PPR (pattern recognition receptor) par des

signaux et des motifs moléculaires bactériens MAMP (microbial-associated molecular pattern) (Putsep et al., 2000). Par exemple, l'activation des récepteurs de surface des cellules épithéliales (TLR, Toll-Like Receptor) contrôle l'expression du peptide C-type lectines (Brandl et al., 2007; Vaishnava et al., 2008). Egalement, l'activation du récepteur cytoplasmique NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) contrôle l'expression d'une sous classe d' $\alpha$ -défensines produite par les cellules de Paneth dans les cryptes (Kobayashi et al., 2005).

Les mesures biochimiques de l'activité des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales indiquent qu'ils sont retenus et concentrés dans la couche de mucus (Meyer-Hoffert et al., 2008). Cette observation suggère que cette dernière forme une barrière qui diffuse et concentre les peptides anti-microbiens près de la surface des cellules épithéliales, ce qui augmente probablement leur efficacité à protéger ces surfaces contre la colonisation microbienne.

#### **III.1.4. Sécrétion de cytokines et chimiokines**

Les cellules épithéliales synthétisent de nombreuses cytokines et chimiokines<sup>14</sup> capables de réguler les réponses immunitaires innées et adaptatives locales. Le profil de sécrétion par les entérocytes est dépendant des conditions locales, certaines chimiokines comme CCL25 (Chemokine C-C motif ligand 25) et CCL28 sont synthétisées de façon constitutives, tandis que d'autres sont induites essentiellement dans des conditions d'inflammation pathologique comme l'IL-8 (Interleukine-8).

### **III.2. Activation de la réponse immunitaire innée**

La réponse immunitaire innée, immédiate et non spécifique, initie une défense antimicrobienne à large spectre et est essentielle à la mise en place de la réponse adaptative. Cette dernière, caractérisée par la reconnaissance d'antigènes par des cellules immunitaires (lymphocytes T et B), permet l'élimination du pathogène et la mise en place d'une mémoire immunologique spécifique du pathogène rencontré.

#### **III.2.1. Reconnaissance des antigènes microbiens par les PRR**

Lorsqu'un micro-organisme entre en contact étroit avec l'épithélium intestinal, il est détecté comme agent étranger. Il est discriminé du soi grâce à sa reconnaissance rapide et efficace par un ensemble des récepteurs spécifiques de l'immunité innée, exprimés par les

---

<sup>14</sup> Les cytokines sont des molécules solubles de communication sécrétées par des cellules immunitaires et agissantes à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Les chimiokines sont des cytokines chemoattractantes dont la fonction est d'attirer les cellules du système immunitaire.

cellules épithéliales, les cellules présentatrices d'antigènes (DC) et les macrophages. Ces récepteurs membranaires et intracellulaires appelés PRR (Pattern Recognition Receptor) permettent la reconnaissance et l'identification de motifs moléculaires précis conservés au sein des espèces microbiennes appelés les MAMP (microbial-associated molecular pattern). Les quatre familles de PRR identifiées à ce jour comprennent la famille des TLRs (Toll-like receptor), les lectines de type C, la famille des NLRs (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor) et les RIG (Retinoic acid-inducible gene I-like receptors) (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2008).

L'activation de ces PRRs aboutit à la transcription de médiateurs inflammatoires (cytokines et chimiokines proinflammatoire, interféron de type I) de la réponse innée nécessaires à la défense de l'hôte et participe au développement d'une immunité adaptative spécifique (Kumar et al., 2009b).

### **III.2.2. Différentes classes de PRR et leur localisation**

Les classes de PRR mentionnées plus haut se distinguent entre elles en fonction du répertoire des motifs microbiens reconnus (ADN, ARN, protéines, lipides...) et de leur localisation et distribution (surface cellulaire, lysosomique et cytoplasmique). Dans les cellules de l'intestin, les deux principales classes de PRR sont les TLR et les NLR.

#### ***a. Les récepteur Toll-like (TLR)***

Les TLR sont des récepteurs conservés durant l'évolution, des homologues étant retrouvés chez les insectes et les vertébrés (Anderson, 2000; Delneste et al., 2007). Le premier membre de la famille, nommé toll, a été identifié chez *Drosophila melanogaster* et intervient dans le développement embryonnaire (Lemaitre et al., 1996) et dans l'activation de la réponse immunitaire innée contre les infections fongiques (Hoffmann et al., 1996). Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires caractérisées par un domaine extracellulaire constitué de répétitions des motifs riche en leucine LRR (leucine-rich repeat) et un domaine transmembranaire couplé à un domaine cytoplasmique nommé TIR (Toll/IL-1R interaction domain) (Akira, 2001; Janeway and Medzhitov, 2002). Le domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance des MAMPs (bactéries, parasites, champignons, virus).

À ce jour, les TLRs comportent 13 membres chez les mammifères, 10 chez l'Homme et 13 chez la souris (Beutler, 2004). Les TLR1-9 sont conservés entre les deux espèces, tandis que le TLR10 est spécifique de l'Homme et les TLR11-13 de la souris (Akira, 2003). Bien que la caractérisation et l'identification des TLR1-9 et 11 soit bien avancée, les rôles biologiques (pattern d'expression, mode de communication et ligands) des TLR10, 12 et 13

demeurent inconnus. Ces récepteurs agissent en homodimères ou hétérodimères pour reconnaître leurs ligands. Les TLRs sont exprimés par de nombreux types cellulaires. Leur distribution subcellulaire est associée à la nature des ligands qu'elles reconnaissent par leur domaine LRR.

### a.1. TLR membranaires

Les TLR membranaires sont exprimés à la surface des cellules et reconnaissent principalement des composants membranaires des micro-organismes. Parmi les 10 TLR présents chez l'homme, 6 d'entre eux (TLR1, TLR2, TLR4 à TLR6 et TLR11) ont une localisation membranaire.

Le TLR2 est initialement associé à la reconnaissance de composants de paroi des bactéries à coloration Gram positif comme le peptidoglycane et les acides lipotéichoïques (LTA) (Schwandner et al., 1999). Il reconnaît également le liparabinomannane des mycobactéries (Underhill et al., 1999) et le LPS atypique de *Leptospira interrogans* (Werts et al., 2001) ou de *Porphyromonas gingivalis* (Tabeta et al., 2000). Ce récepteur fonctionne généralement en hétérodimère avec les TLR1 et TLR6. La formation d'hétérodimères TLR2/TLR1 et TLR2/TLR6 permet de discriminer, respectivement, les lipopeptides triacylés des bactéries à coloration Gram négatif et le lipopeptides diacylés des autres bactéries (Jin et al., 2007; Kang et al., 2009). Il existe une forme homodimère TLR2/2 capable de lier le peptidoglycane (Kawai and Akira, 2007b).

Le TLR4 reconnaît quant à lui le LPS (lipopolysaccharide), un des composants structuraux majeurs de la paroi des bactéries à coloration Gram négatif (Hoshino et al., 1999). L'identification de ce ligand résulte d'expériences de clonage positionnel qui ont montré que les souris résistantes au LPS présentent une mutation dans un gène codant pour une molécule apparentée à Toll, appelée plus tard TLR4 (Poltorak et al., 1998). Pour amplifier la réponse immunitaire, le LPS se fixe à la molécule LBP (Lipopolysaccharide binding protein) présente dans le sérum ; ce complexe LPS-LBP se fixe alors au récepteur CD14. Le complexe CD14-LPS-LBP est reconnu par la protéine MD-2 (myeloid differentiation factor 2) associée à l'homodimère TLR4 afin de mettre en place la réponse innée (Akashi et al., 2001; Shimazu et al., 1999). Une étude de cristallographie réalisée en 2009 a montré que deux complexes TLR-4-MD-2-LPS interagissent systématiquement pour former un homodimère (Park et al., 2009). Le TLR-4 reconnaît également la pneumolysine, une toxine cytosolique produite par *Streptococcus pneumoniae* (Malley et al., 2003).

Le ligand spécifique du TLR5 est un domaine très conservé de la flagelline bactérienne extracellulaire (Akashi et al., 2001). Au départ, il semble que le TLR5 soit plutôt exprimé du côté basolatéral et non au pôle apical des cellules épithéliales (Gewirtz et al., 2001) mais une étude récente suggèrent une localisation bipolaire de ce récepteur (Bambou et al., 2004).

Le TLR11, présent uniquement chez la souris, détecte les bactéries uropathogènes et une molécule de type « profine » provenant du parasites *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky et al., 2005; Zhang et al., 2004).

#### *i. TLR endosomaux*

Les TLR3, 7, 8 et 9 sont localisés dans le compartiment intracellulaire, dans des vésicules appelées endosomes/lysosomes et sont spécialisés dans la détection des acides nucléiques (ADN et ARN) de diverses origines.

Les TLR3 reconnaissent les ARN double-brin des virus du groupe III (ex : Rotavirus) (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hornung et al., 2005). Ils sont également impliqués dans la détection du ligand poly I:C (polyinosinic polycytidylic acid) un homologue structural synthétique de l'ARN double-brin (Alexopoulou et al., 2001). Une analyse structurale a montré que la fixation de l'ARN double-brin génère une dimérisation du TLR3 (Choe et al., 2005; Liu et al., 2008).

Le ligand des molécules TLR7 murine et TLR7/8 humaines est l'ARN simple brin composant le génome des virus des groupes IV et VI (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). Ainsi des petites molécules synthétiques aux propriétés antivirales comme l'imidazoquinoline (R-848) (Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002).

Le TLR9 reconnaît des motifs spécifiques CpG (zone riche en GC) non méthylés présent dans les ADN bactériens et viraux (Hemmi et al., 2000). Ce récepteur endosomal permet donc de détecter la présence des virus et les bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* capable de se répliquer dans le cytoplasme des cellules épithéliales. Une étude récente a montré que le TLR9 pouvait détecter aussi des molécules de cristaux insolubles d'hémozoïne obtenues après détoxification de l'hémoglobine par *Plasmodium falciparum* (Coban et al., 2005).

#### *b. Les récepteurs Nod-like (NLR)*

Le système TLR n'étant pas accessible pour la détection de pathogènes ayant envahi le cytosol, d'autres familles de récepteurs, tels que les molécules NLR (*NOD-like receptor*) permettent une reconnaissance cytosolique des composés bactériens (Meylan et al., 2006).

Ces récepteurs sont conservés au cours de l'évolution entre les mammifères et les plantes (DeYoung and Innes, 2006). Ils comprennent trois domaines : (i) un domaine C-terminal riche en LRR responsable de la reconnaissance des motifs microbiens, (ii) une région centrale conservée NOD (Nucleotide-binding oligomerisation domain) impliquée dans la fixation des nucléotides et l'auto-oligomérisation et (iii) un domaine effecteur N-terminal impliqué dans l'initiation de la signalisation. Ce dernier peut être soit un domaine CARD (caspase-activation and recruitment domain), PYD (pyrine domain) ou BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat).

Des études de bioinformatiques ont révélé la présence, dans le génome humain et murin respectivement, de 23 et 34 gènes codant pour des NLR (Harton et al., 2002) dont les plus étudiés sont les Nod1 et Nod2. Ces deux molécules reconnaissent des sous-unités distinctes du peptidoglycane, un composant structural de la paroi bactérienne. Nod1 reconnaît le peptidoglycane contenant du DAP (acide meso-diaminopimélique) retrouvé essentiellement chez les bactéries à coloration Gram négatif (Fritz et al., 2006). En revanche, Nod2 détecte un motif de peptidoglycane le MDP (muramyl-dipeptide) commun aux bactéries à coloration Gram positif et négatif (Chamaillard et al., 2003; Girardin, 2003).

L'activation de ces récepteurs nécessite l'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales par endocytose ou par phagocytose dans les CPA (cellules présentatrices d'antigènes). Ils induisent et mettent en place une réponse immunitaire innée caractérisée par la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-18) et de peptides anti-microbiens (défensines, cryptdines, etc.) pour éliminer les intrus. Divers travaux ont montré, que les macrophages déficients en Nod1 et Nod2 ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires en réponse à leurs ligands (Kobayashi et al., 2005), et que le récepteur Nod2 est impliqué dans les maladies inflammatoires intestinales (Hugot et al., 2001).

La famille des protéines NALP (NACHT-, LRR-, and PYD containing protein), quant à elle, assure l'activation de l'inflammasome, un gros complexe protéique catalytique permettant l'activation des caspases 1 et 5 (Martinon et al., 2002). Ces derniers induisent la maturation et sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18, ainsi que le déclenchement de l'apoptose. Les ligands de la famille NALP sont inconnus, sauf pour le NALP3 qui reconnaît l'ARN bactérien (Kanneganti et al., 2006), l'ATP et les cristaux d'acides uriques (Mariathasan et al., 2006; Martinon et al., 2006).

La famille des NLRs regroupe aussi les membres des protéines Ipaf (IL-1 $\beta$ -converting enzyme-protease-activating factor) et NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein). Ces deux

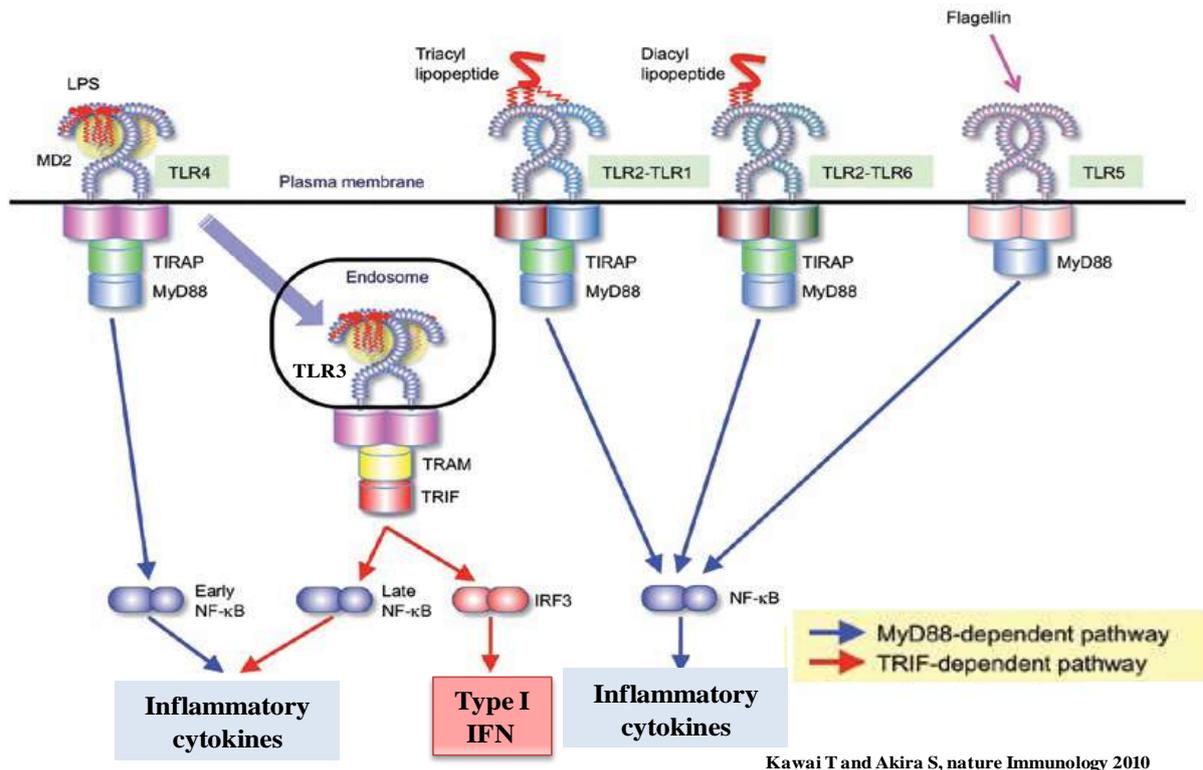
familles de protéines sont impliquées dans l'activation de la caspase-1, et par conséquent l'induction de l'inflammation. Entre autre, cette activation se fait, après reconnaissance de la flagelline intracellulaire portée par *Salmonella typhimurium* ou *Legionella pneumophilla* lors de la prolifération de ces bactéries dans le cytoplasme des cellules de hôte (Mariathasan et al., 2004; Martinon et al., 2006).

### III.2.3. Différentes signalisations via PRR

La stimulation des PPRs par un large répertoire des MAMP active de nombreuses voies de signalisation nécessaires à la mise en place d'une réponse immunitaire et inflammatoire protégeant l'hôte des micro-organismes néfastes (West et al., 2006).

La liaison du ligand microbien à son TLR induit un changement de conformation du récepteur nécessaire à la transduction du signal *via* le recrutement d'une ou plusieurs molécules adaptatrices grâce à leurs domaines TIR intracellulaire. Ce processus conduit à une cascade de signalisation permettant l'activation de gènes impliqués dans les mécanismes de défense de l'hôte. La différence entre la nature des cascades de signalisation induite par chaque TLR peut être partiellement expliquée en fonction des molécules adaptatrices recrutées au niveau du domaine TIR (Akira, 2006). A ce jour, cinq molécules adaptatrices ont été identifiées : MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), TRIF (TIR domain containing adaptator inducing IFN $\beta$ ), TIRAP/Mal (TIR domain containing adaptator protein/MyD88 adaptator-like protein) et TRAM (TRIF – related adaptator molecule), et enfin l'adaptateur SARM (Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein) qui inhibe la signalisation dépendante de TRIF (O'Neill and Bowie, 2007).

Suivant la protéine adaptatrice associée, le récepteur TLR peut initier différentes signalisations comme la voie dépendante de MyD88 conduisant à la synthèse de cytokines inflammatoires ou la voie dépendante de TRIF impliquée dans la production des IFN inductibles (Kawai and Akira, 2007a) (**Figure 11**). Ces deux voies de signalisation conduisent à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), un élément clef contrôlant l'activation des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire.



**Figure 11 : Adaptateurs et voies de signalisation utilisés par les TLR  
(Kawai T and Akira S Nature/Immunol, 2010)**

Après reconnaissance de leur agonistes, les TLR recrutent différents adaptateurs qui initient les cascades de signalisation aboutissant à la production de cytokines inflammatoire ou d'interféron de type I. MyD88, l'adaptateur principal utilisé par tous les TLR excepté le TLR3 qui recrute d'adaptateur TRIF. TRAM et TIRAP sont les adaptateurs accessoires de MyD88 et TRIF.

TLR: Toll-Like Receptor; MyD88: facteur de différenciation myéloïde 88; TRIF: domaine TIR contenant un adaptateur induisant l'interféron b; TIRAP: domaine TIR contenant une protéine adaptatrice; TRAM: adaptateur apparenté à TRIF; INF, interféron

#### *a. Signalisation dépendante de MyD88*

L'association de l'adaptateur MyD88 avec le domaine cytoplasmique TIR de tous les TLR sauf du TLR3 acyivés par un MAMP, permet de recruter et d'activer la kinase IRAK-4 (IL-1R associated kinase 4) grâce au domaine DD (death domain) de MyD88 (Suzuki et al., 2002; Swantek et al., 2000). La formation du complexe MyD88/IRAK-1 permet la phosphorylation d'IRAK-1 qui recrute à son tour la protéine TRAF6 (TNFR-associated factor 6). Ensuite IRAK-1 et TRAF6 se séparent du complexe pour activer la kinase TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase1). La molécule TAK1 couple les voies de transduction aboutissant à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B par la phosphorylation de IKK (inhibitor of  $\kappa$ B kinase) ou AP-1 (activator protein 1) *via* la phosphorylation des MAPK (mitogen-activated protein kinase). L'induction de ces voies favorise l'expression de nombreux gènes codant notamment pour des cytokines pro-inflammatoires comme IL-8, TNF- $\alpha$  et IL6 (Karin and Ben-Neriah, 2000).

### *b. Signalisation dépendante de TRIF*

L'activation du TLR3 et TLR4 par leurs ligands, permet le recrutement de l'adaptateur TRIF qui, comme MyD88, active la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. La protéine TRIF interagit directement, par son domaine C-terminal, avec la protéine TRAF6 et *via* son domaine N-terminal, avec la kinase RIP1 (receptor interacting protein 1). Cette protéine, également impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B par les récepteurs au TNF, forme un complexe avec TRAF6. Le complexe RIP1/TRAF6 ainsi formé active la kinase TAK1 et par conséquent l'activation de NF- $\kappa$ B *via* une signalisation identique à MyD88.

La signalisation dépendante de TRIF, contrôle également l'activation de facteurs de transcription de la classe des IRF (Interferon regulatory factors) conduisant à la mise en place d'une réponse interféron<sup>15</sup> (IFN) de type I (Honda et al., 2006). Une étude de Kaisho a montré que les souris déficientes en TRIF sont incapables d'activer les facteurs de transcription IRF3 responsable de l'expression des IFN inductibles permettant la maturation des DC et la sécrétion d'IFN- $\beta$  (Kaisho et al., 2001). Les protéines IRF3 et IRF7 initialement présentes dans le cytoplasme sous forme inactives, sont phosphorylées au niveau de leur domaine C-terminal suite à l'activation des récepteurs TLR3 et/ou TLR4. Ces deux protéines phosphorylées forment des homodimères qui transloquent dans le noyau pour activer des gènes codant pour l'IFN- $\beta$  (contrôlé par IRF3) (Takeuchi and Akira, 2010) et l'IFN- $\alpha$  (contrôlé par IRF7).

### *c. Signalisation via les NLRs*

La reconnaissance des MAMP par les NLR induit l'activation de la signalisation NF- $\kappa$ B (Nod1 et Nod2) et des caspases-1 et 5 (inflammasome) pour NALP3, Ipaf et NAIP. Après la reconnaissance du peptidoglycane bactérien, Nod1 (ou Nod2) interagit par son domaine N-terminal avec le domaine CARD de la molécule effectrice RIP2. Le complexe Nod1/RIP2 (ou Nod2/RIP2) active ensuite la kinase IKK nécessaire à l'activation NF- $\kappa$ B. L'activation de Nod2 permet en parallèle l'activation des MAPK, conduisant à l'induction d'AP-1.

La stimulation de NALP3 par ses ligands (ARN bactérien, toxines) active la formation de l'inflammasome ; un complexe protéique composé de NALP3, de la protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein) et des caspases 1 et 5. Ce complexe catalyse l'activation des caspases. Ces dernières clivent les précurseurs pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 pour libérer les formes matures de ces cytokines sécrétées.

---

<sup>15</sup> La réponse interféron est la réponse immunitaire anti-virale. Les IFN- $\beta$  produit par la cellule infectée alerte les cellules voisines pour la mise en place de mécanismes de résistance, et activer les cellules immunitaires compétentes comme les macrophages pour détruire les virus.

#### III.2.4. Autres classes de PRR et leurs fonctions

Il existe deux autres classes de PRR qui sont aussi importantes pour la détection de MAMP ; les CLR (C-type lectin receptor) et RLR (retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor). Les RLR présents dans le cytoplasme de nombreux types cellulaires participent avec les récepteurs TLR3, 7 et 8 à la reconnaissance des virus. Le contact des RLR avec l'ARN viral déclenche l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- $\kappa$ B, contrôlant respectivement la mise en place de la réponse interféron de type I et de la réponse inflammatoire (Kawai and Akira, 2008).

Les récepteurs CLR constituent une famille de protéines exclusivement retrouvée chez les métazoaires capable de reconnaître des motifs carbohydrates de nombreux types de micro-organismes. Ces motifs de structures glycosidiques à base de mannose, de fructose et de glycane sont retrouvés aussi bien chez les virus, les parasites, les champignons et les bactéries (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Ce type de récepteur est principalement exprimé par les cellules immunitaires effectrices comme les monocytes, les DC, les macrophages et les lymphocytes B. Certains CLR, notamment le dectin-1 reconnaissant les glucanes sont exprimés dans d'autres lignées cellulaires (épithéliales pulmonaires et intestinal) (Lee et al., 2009; Saegusa et al., 2004; Volman et al., 2009). Le récepteur au mannose est aussi exprimé par les cellules endothéliales hépatiques (Gazi and Martinez-Pomares, 2009).

En plus de leur rôle dans l'endocytose, ces types de PRR possèdent des propriétés de signalisation cellulaire. La reconnaissance d'un pathogène par les CLR conduit généralement à l'internalisation, la lyse et la présentation d'antigènes. Certains CLR peuvent contrôler la mise en place d'une réponse cellulaire d'une façon autonome, notamment dectin-1 qui induit la sécrétion du TNF- $\alpha$  par les macrophages en réponse à des stimulations fongiques. Il est également impliqué dans la génération des lymphocytes T pro-inflammatoires (Th17) suite à l'induction de cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-23.

#### III.3. Activation de la réponse immunitaire adaptative

Les antigènes alimentaires, les bactéries commensales ou les micro-organismes pathogènes présents dans la lumière intestinale sont transportés au niveau du dôme sous-épithélial de la plaque de Peyer par les cellules M. Ils sont, soit neutralisés et phagocytés directement par les macrophages, soit présentés aux DC locales (Neutra et al., 1996).

Le contenu luminal peut être aussi échantillonné et pris en charge directement par d'autres DC présentes dans la *lamina propria*, juste sous les cellules épithéliales par plusieurs mécanismes. (i) Les antigènes solubles peuvent traverser l'épithélium par voie trans- ou para-

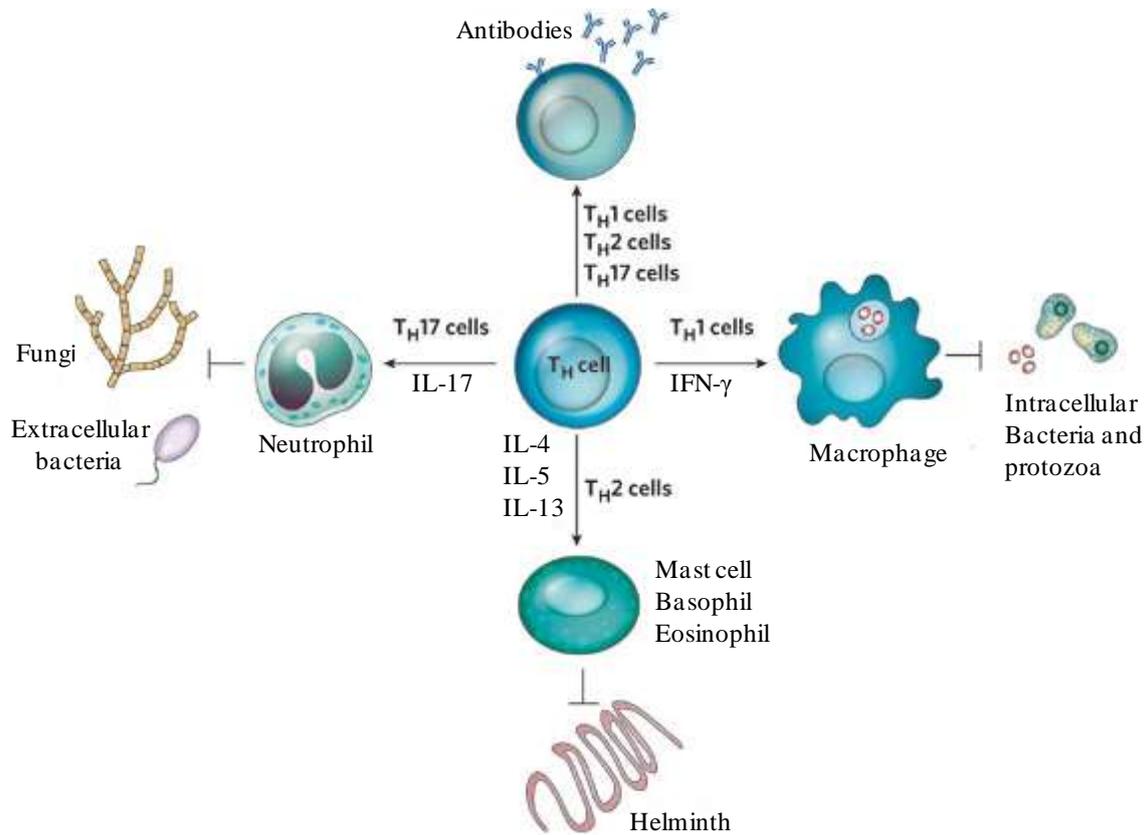
cellulaire et être reprises par les DC (Mowat, 2003). (ii) Certaines DC sont capables d'étirer leurs dendrites et d'étendre des prolongements cytoplasmiques entre deux cellules épithéliales pour détecter et capturer directement des bactéries ou d'autres antigènes présents dans la lumière du tube digestif (Rescigno et al., 2001). Ensuite, ces DC migrent vers les ganglions mésentériques *via* le réseau lymphatique pour présenter aux cellules T naïves les antigènes oraux captés au niveau de la *lamina propria* (Jaensson et al., 2008). Ces lymphocytes T naïfs s'activent et se différencient en plusieurs sous population en fonction des cytokines produites et de la nature de l'antigène.

Les lymphocytes B naïfs sont également sensibilisés et activés par les DC et/ou les lymphocytes T activés et se mettent à produire des IgA (immunoglobulines A). Ces lymphocytes B activés migrent vers les sites effecteurs où ils se différencient en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines sécrétoires.

Une fois les lymphocytes T et B naïfs activés par les DC au niveau du site inducteur du GALT, ils migrent vers le site effecteur où ils neutralisent et éliminent spécifiquement les antigènes néfastes à la santé de l'hôte. En conséquence, ils protègent ce dernier contre les invasions de pathogènes.

### III.3.1. Activation des lymphocytes T

Après la reconnaissance des micro-organismes, les DC les internalisent et présentent à leur surface des antigènes microbiens pouvant être reconnus par des lymphocytes T  $CD_4^+$  naïfs présents au niveau des plaques de Peyer. Ces derniers migrent vers les sites effecteurs de GALT pour alors se différencier, en fonction des signaux reçus des DC lors de l'activation, en différents sous-types de lymphocytes T. Ils sont classés en fonction du panel de cytokines qu'ils sécrètent et de leurs fonctions. Ces différents sous-types incluent les lymphocytes T effecteurs ( $CD_4^+$ ) qui regroupent les classiques T Helper de type 1 (Th1) et de type 2 (Th2), les lymphocytes T helper folliculaires Th17, les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les CD8 (**Figure 12**) (Kapsenberg, 2003; Pulendran et al., 2008). La différenciation des sous-types de lymphocytes T dépend du type de pathogène rencontré. Cette différenciation est principalement gouvernée par les cytokines présentes dans le microenvironnement mais aussi par la force d'interaction du TCR (T cell receptor) avec l'antigène présenté par les DC (Boyton and Altmann, 2002).



**Figure 12 : Origine des lymphocytes T-helper et classe des pathogènes (d'après Medzhitov R, Nature, 2010)**

Lorsque les lymphocytes T naïves circulantes reconnaissent pour la première fois leur antigène spécifique, les cellules T CD4<sup>+</sup> se différencient en plusieurs populations effectrices de type Th1, Th2 et Th17 en fonction de l'infection générée par le pathogène. Les différentes populations Th sont caractérisées par les cytokines qu'elles produisent et par les mécanismes d'actions des différents types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire innée (noté par flèches).

Les lymphocytes Th1, impliqués dans l'immunité cellulaire contre les micro-organismes intracellulaires, sont caractérisés par la production de l'interféron-γ (IFN-γ). Ce dernier stimule la phagocytose par les macrophages et favorisent la production d'anticorps IgA par les lymphocytes B. Ils sont générés principalement par les antigènes viraux ou bactériens en présence d'IL-12 (produite par les DC activées).

Les lymphocytes Th2, requis pour l'immunité humorale, notamment pour l'élimination des parasites et de différents pathogènes extracellulaires, produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (Stetson et al., 2004). Ces cytokines régulent principalement l'activation et la maturation des lymphocytes B et des leucocytes polynucléaires (éosinophiles, basophiles).

Les cellules Th17 jouent un rôle dans le maintien homéostasique de la barrière épithéliale contre les attaques extérieures par un grand nombre de bactéries et de champignons (Dubin and Kolls, 2008). Elles ont aussi un rôle dans les syndromes

inflammatoires chroniques et les maladies auto-immunes (Ouyang et al., 2008; Steinman, 2008). Lorsqu'ils sont activés par l'IL-6 et l'IL-23, les lymphocytes Th17 produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 et initient rapidement une réponse inflammatoire dominée par les polynucléaires neutrophiles. La réponse immunitaire gouvernée par les lymphocytes Th17 est importante au niveau de l'épithélium et de la surface des muqueuses. Ceci étant dû au panel de récepteurs aux chimiokines et aux cytokines effectrices qu'ils expriment (Aujla et al., 2008; Ouyang et al., 2008).

Les lymphocytes Treg ( $CD4^+ CD25^+$ ) sont essentiels dans le maintien de la tolérance au soi des antigènes luminaux (alimentaires, micro-organismes) de façon à prévenir l'apparition de maladies auto-immune (Izcue and Powrie, 2008; Powrie et al., 2003; Sakaguchi et al., 1995). Ces cellules sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription FOXP3 (forkhead box P3) contrôlant leur développement. Elles secrètent des molécules immuno-suppressives (IL-10 et TGF- $\beta$ ) qui contrôlent les fonctions des lymphocytes T effecteurs en inhibant respectivement la prolifération et la conversion en lymphocytes Treg. Ces cytokines contrebalancent les fonctions pro-inflammatoires des lymphocytes T effecteurs et modulent l'état de l'activation et la maturation des DC (Sakaguchi et al., 2008).

Enfin, les lymphocytes T cytotoxiques ( $CD8^+$ ) sont en majorité intra-épithéliaux et intercalés entre les entérocytes. Ces cellules agissent comme première ligne de défense chargée de détruire les pathogènes en contact avec l'épithélium, notamment les virus (Cheroutre, 2004; Nanno et al., 2007).

### **III.3.2. Activation des lymphocytes B**

Les lymphocytes B naïfs sensibilisés et activés au niveau du site inducteur du GALT arrivent au site effecteur où ils se différencient en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines sécrétoires (IgA). Cette différenciation dépend de la reconnaissance de l'antigène par le récepteur des cellules B ou BCR (B cell receptor) et de leur interaction avec les lymphocytes T effecteurs *via* une synapse immunologique (Ruprecht and Lanzavecchia, 2006). Classiquement, les DC présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs qui interagissent par la suite avec les lymphocytes B (Garside et al., 1998). Cette activation des lymphocytes B par les cellules T met en jeu une interaction entre la molécule CD40 présente sur les lymphocytes B et son ligand CD40L exprimé par les cellules T activées en présence du TGF- $\beta$  (Defrance et al., 1992). Les DC du GALT peuvent induire et influencer la fonction des lymphocytes B par d'autres mécanismes indépendants des cellules T.

Les lymphocytes B une fois différenciés en plasmocytes, sécrètent des IgA dimériques qui sont transportées par les entérocytes grâce à leur récepteur pIgR (polymeric Ig receptor) vers la lumière intestinale (Brandtzaeg et al., 1989). Les IgA vont se lier spécifiquement à des antigènes ou des micro-organismes cibles pour les neutraliser. Ils contribuent ainsi à diminuer et restreindre l'entrée de ces antigènes dans la muqueuse intestinale. Cette production d'anticorps (réponse humorale) est importante pour éviter les pullulations bactériennes et l'entrée des protéines allergisantes dans la lumière intestinale (Macdonald and Monteleone, 2005; Mowat, 2003).

## Chapitre III : NF- $\kappa$ B élément clef de la réponse immunitaire et inflammatoire

Découvert il y a vingt cinq ans par le groupe David Baltimore, NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription régissant de nombreux mécanismes cellulaires. Il joue un rôle clef dans la réponse immune, inflammatoire, proliférative et apoptotique mais aussi dans la tumorigenèse.

L'intérêt de la communauté scientifique pour ce facteur de transcription NF- $\kappa$ B est toujours aussi soutenu. Il présente des caractéristiques originales, en particulier la rapidité de sa régulation, sa sensibilité à un nombre immense de stimuli, la grande variété des gènes qu'il contrôle et son implication dans des pathologies diverses. En effet, il régule positivement ou le plus souvent négativement l'apoptose suivant le type cellulaire. Cet effet l'impliquerait dans la progression tumorale des adénocarcinomes. Ce facteur intervient également dans les pathologies inflammatoires du tube digestif. De ce fait, NF- $\kappa$ B est la cible de plusieurs médicaments anticancéreux et anti-inflammatoires.

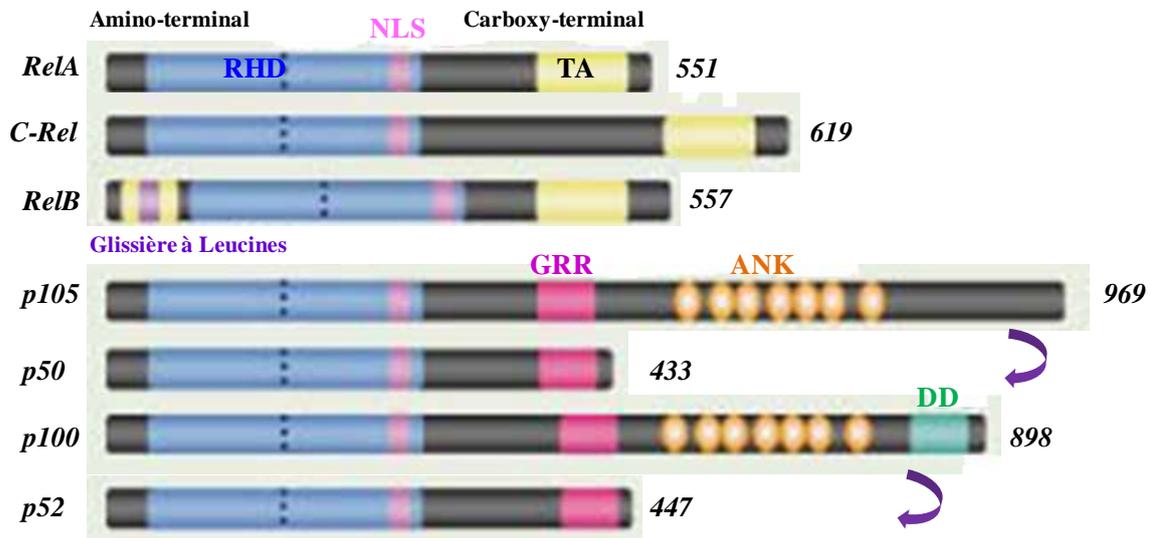
### I. Généralités

NF- $\kappa$ B a été caractérisé pour la première fois en analysant les régions régulatrices de la chaîne légère kappa des immunoglobulines dans les cellules B matures (Sen and Baltimore, 1986). Les protéines NF- $\kappa$ B sont des activateurs transcriptionnels présents dans la cellule sous forme de dimères. En absence de signaux extracellulaires spécifiques, les dimères NF- $\kappa$ B sont retenus dans le cytoplasme sous une forme inactive par leur interaction avec les molécules inhibitrices de la famille I $\kappa$ B. A la suite de diverses stimulations (par des cytokines dont le TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , des protéines bactériennes ou virales, et divers signaux de stress), les inhibiteurs I $\kappa$ B sont phosphorylés par un complexe kinase IKK. Ces événements de phosphorylation entraînent l'ubiquitinylation des I $\kappa$ B puis leur dégradation par le protéasome. Par conséquence, les dimères NF- $\kappa$ B sont transloqués dans le noyau où ils se fixent sur les promoteurs de leurs gènes cibles notamment ceux impliqués dans les réponses immune et inflammatoire.

Quatre niveaux combinatoires peuvent être décrits pour la régulation de l'activité de NF- $\kappa$ B : la nature des complexes formés par les différentes sous-unités NF- $\kappa$ B, les inhibiteurs impliqués, les voies de signalisations et les sites retrouvés sur les promoteurs des gènes cibles de NF- $\kappa$ B.

## I.1. Sous-unités NF- $\kappa$ B

La famille NF- $\kappa$ B compte cinq membres décrits chez les mammifères: p50 (NF- $\kappa$ B1) et p52 (NF- $\kappa$ B2) qui sont les formes courtes et actives issues de la protéolyse de la partie C-terminale de leurs précurseurs respectifs de p105 et p100, RelA (p65), RelB et c-Rel (**Figure 13**).



**Figure 13 : Structure des membres de la famille NF- $\kappa$ B (Baud and Jacque 2008)**

Les protéines NF- $\kappa$ B sont caractérisées par la présence d'un **RHD (Rel Homology Domain)**, la séquence de localisation nucléaire (**NLS, Nuclear Localisation Sequence**). RelA, c-Rel et RelB contiennent un domaine de **transactivation (TA, TransActivation)**. RelB possède un domaine TA amino-terminal contenant un motif de type **glissière à Leucines (Leucine zipper)**. Les protéines précurseurs p105 et p100 contiennent 7 répétitions **ankyrines (ANK)**, ainsi qu'une région riche en **glycines (GRR, Glycine-Rich Region)**.

Toutes les sous-unités sont caractérisées par la présence d'un domaine hautement conservé, le domaine RHD (Rel Homology Domain) responsable à la fois de la dimérisation et de la liaison à l'ADN (Verma et al., 1995). Les protéines RelA, RelB et c-Rel présentent un domaine de transactivation TAD (Transcription Activation Domain) dans la partie carboxy-terminale. Les protéines p52 et p50 ne possèdent pas de domaine transactivation, c'est la liaison avec les autres sous-unités qui leur permet de réguler la transcription. Les protéines précurseurs p100 et p105 se distinguent par la présence de nombreuses répétitions ankyrines (domaine d'interaction protéine-protéine) dans la partie carboxyl-terminale. Ces domaines ankyrines sont responsables de la localisation cytoplasmique de p100 et p105.

Généralement, les membres de la famille NF- $\kappa$ B fonctionnent en homodimères et/ou en hétérodimères *in vivo*, à l'exception de RelB qui ne fonctionne qu'en hétérodimère (Huang et al., 2005). Les différentes combinaisons de dimères contribuent à la diversité en termes de régulation transcriptionnelle. En effet, la stabilité des dimères *in vivo* et leur affinité pour le site de liaison à l'ADN sont différentes. Les homodimères c-Rel/c-Rel sont plus stables que

les homodimères RelA/RelA. Les sous-unités p50 et p52 se lient préférentiellement sur la partie 5' du site  $\kappa$ B alors que RelA, c-Rel et RelB se lient plutôt à la partie 3' (Chen and Ghosh, 1999; Chen et al., 2000).

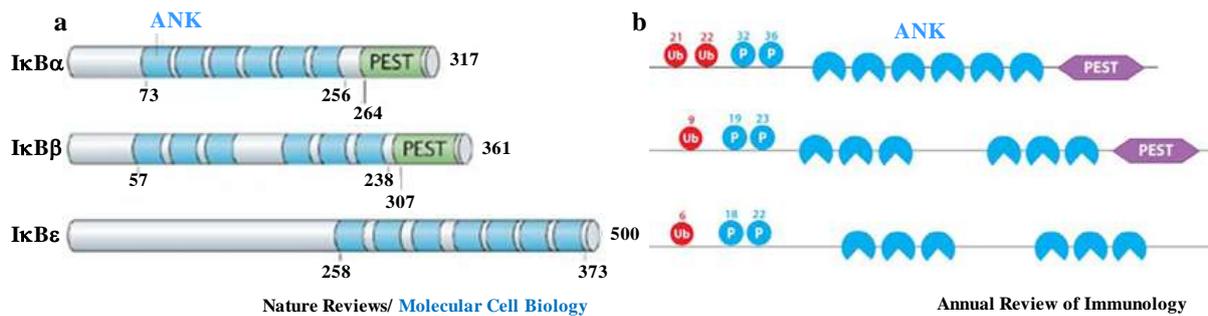
## I.2. Inhibiteurs I $\kappa$ B

L'activité NF- $\kappa$ B est essentiellement régie et contrôlée par l'interaction avec des protéines inhibitrices de la famille I $\kappa$ B (Gilmore, 2006; Hayden and Ghosh, 2008). Les protéines de la famille NF- $\kappa$ B sont immobilisées dans le cytoplasme par l'une des protéines I $\kappa$ B. Il existe plusieurs protéines I $\kappa$ B ayant des affinités différentes pour les complexes NF- $\kappa$ B. La famille des protéines I $\kappa$ B inclue : les inhibiteurs « classiques » ; I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , les précurseurs p100 (I $\kappa$ B $\delta$ ) et p105 (I $\kappa$ B $\gamma$ ) et les inhibiteurs « atypiques » ; BCL3 (B cell CLL/lymphoma 3), I $\kappa$ B $\zeta$  (ou INAP ou MAIL), et I $\kappa$ BNS. L'interaction des inhibiteurs classiques et des précurseurs p100 et p105 avec les protéines NF- $\kappa$ B empêche leur transport vers le noyau grâce au masquage de leur signal de localisation nucléaire. En revanche, les inhibiteurs atypiques ont une localisation nucléaire et interviennent dans la régulation transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B.

L'activité des inhibiteurs est régulée par phosphorylation et protéolyse. Les protéines I $\kappa$ B partagent une structure similaire avec des répétitions ankyrines et des sites de phosphorylation et d'ubiquitination permettant leur dégradation par le protéasome<sup>16</sup> (Ghosh et al., 1998; Karin and Ben-Neriah, 2000). L'inhibiteur I $\kappa$ B des dimères p50/RelA possède deux sites de phosphorylation (sérine 32 et 36), deux sites d'ubiquitinylation (lysine 21 et 22) et un domaine PEST en carboxy-terminal riche en résidus proline, glutamate, sérine et thréonine. Ce domaine est relié au phénomène de dégradation ainsi qu'à l'inhibition de la liaison à l'ADN du complexe NF- $\kappa$ B (Malek et al., 1998; Mathes et al., 2008; Phelps et al., 2000) (**Figure 14**).

---

<sup>16</sup> Le protéasome est un complexe protéique dont la fonction est de dégrader les protéines de manière spécifique ; les protéines à éliminer sont marquées avec des protéines ubiquitines et des enzymes ubiquitine-ligases. Il existe trois familles d'enzyme (E1, E2, E3) qui coopèrent pour former une chaîne de quatre ubiquitines minimum sur la protéine à dégrader afin que celle-ci soit reconnue par le protéasome. E1 a pour fonction d'activer l'ubiquitine et E2 sert d'intermédiaire pour qu'une ligase E3 puisse transférer les ubiquitines sur la protéine cible.

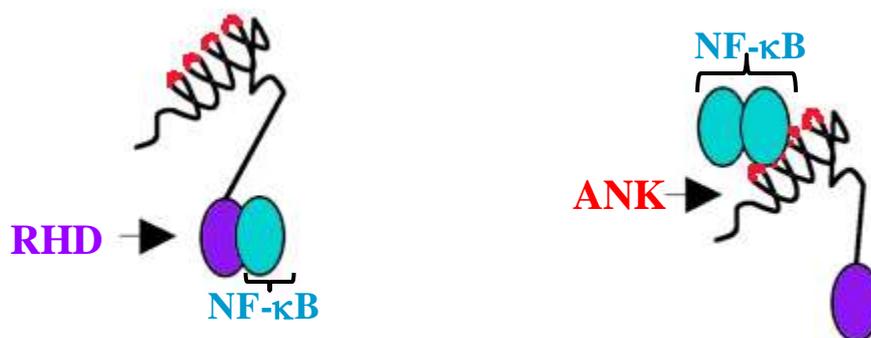


**Figure 14 : Les membres classiques de la famille des inhibiteurs IκB**

- a. La famille des inhibiteurs IκB est composée d'IκBα, β et ε (Neil D. Perkins 2007)
- b. La structure schématique des membres de la famille des inhibiteurs IκB contient des répétitions ankyrines (ANK), des sites de phosphorylation (P) et d'ubiquitinylation (Ub) et le domaine PEST est indiqué en carboxy-terminal (Vallabhapurapu and Karin 2009).

Bien que les inhibiteurs présentent des structures similaires, il existe des différences en termes d'affinités pour les sous-unités NF-κB. En effet, IκBα se lie préférentiellement aux hétérodimères RelA/p50 (Karin and Delhase, 2000). IκBε se lie plutôt aux complexes RelA/RelA et c-Rel/RelA, alors qu'IκBβ se lie aux complexes RelA/p50 (Weil et al., 1997; Whiteside et al., 1997). Le BCL3 se lie aux dimères contenant p50 et p52, IκBζ et IκBNS interagissent tous deux avec la sous-unité p50 (Yamamoto and Takeda, 2008).

Le précurseur p105 est l'inhibiteur de p50, c-Rel et RelA, et p100 est l'inhibiteur de RelB. Ces deux précurseurs peuvent se lier aux sous-unités NF-κB directement grâce aux domaines de dimérisation RHD ou par l'interaction avec les répétitions ankyrines (Figure 15) (Savinova et al., 2009).



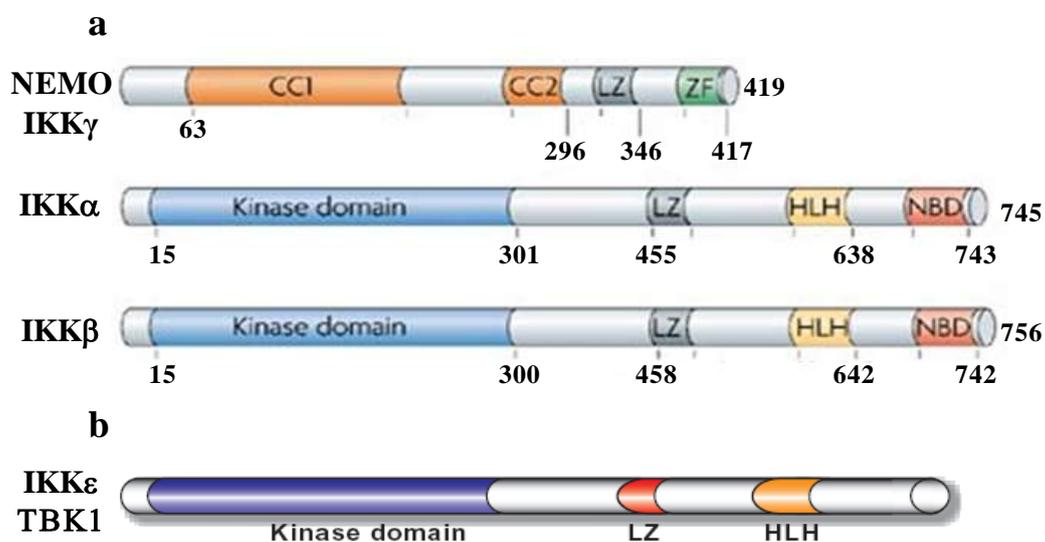
**Figure 15 : Deux modes de liaison de p100 et p105 à NF-κB (Savinova et al. 2009).**

La sous-unité NF-κB peut interagir grâce aux domaines RHD avec p100 ou p105 (à gauche). Les dimères NF-κB peuvent être fixés aux inhibiteurs p100 et p105 via leur domaine ANK.

### I.3. Complexe IKK

La voie NF-κB met en jeu un complexe protéique IKK (Inhibiteur of κB Kinase) crucial pour la cascade de signalisation. La famille IKK est composée de cinq protéines qui s'associent entre elles pour former un complexe actif (Figure 16). Il existe trois complexes

différents. Le plus commun est le complexe multi-protéique comprenant deux sous-unités catalytiques,  $IKK\alpha$  et  $IKK\beta$ , et une sous-unité régulatrice  $IKK\gamma$  aussi appelée NEMO (NF- $\kappa$ B Essential Modulator). Le second est composé seulement de deux sous-unités  $IKK\alpha$ . Les sous-unités  $IKK\epsilon$  et TBK1 bien qu'elles partagent les traits morphologiques des autres kinases IKK, elles ne participent pas à l'activation de NF- $\kappa$ B. Aucune des deux n'est retrouvée en complexe avec NEMO. Les protéines  $IKK\epsilon$  et TBK1 forment ensemble un complexe actif impliqué dans la réponse interféron décrite précédemment.  $IKK\epsilon$  existe également en complexe avec les protéines p52 et p65 mais avec une fonction biologique peu caractérisée (Wietek et al., 2006).

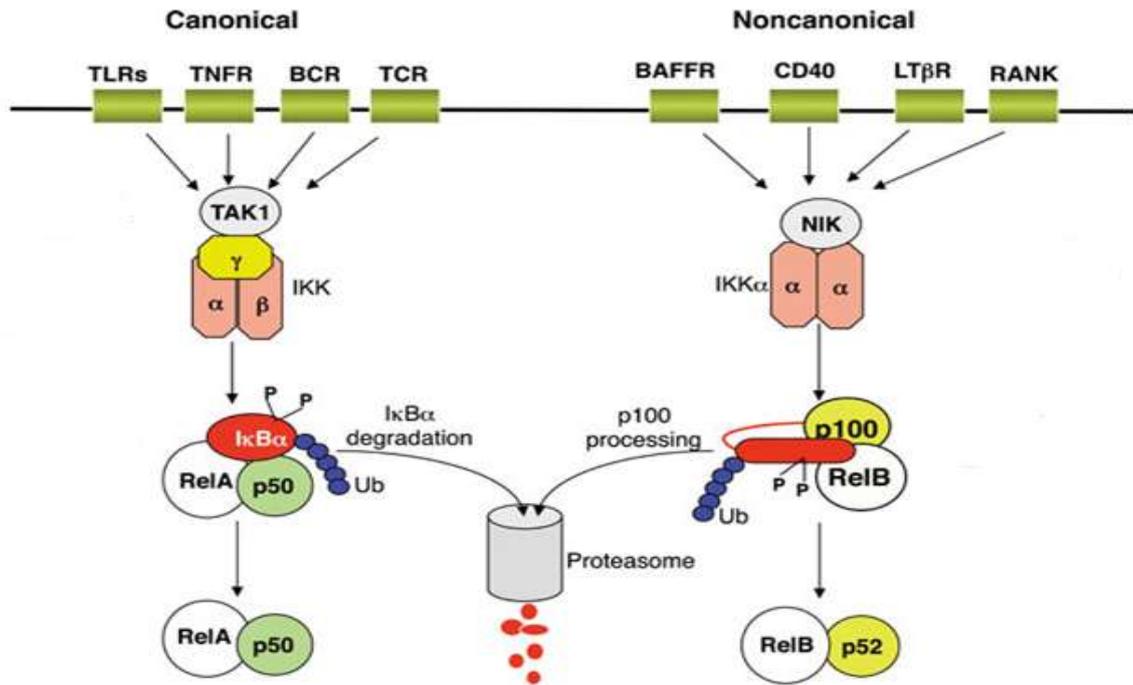


**Figure 16 : Les membres classiques de la famille du complexe IKK.  
(Modifiée d'après Neil D. Perkins 2007)**

La famille du complexe IKK est formée de cinq sous-unités; 2 sous-unités régulatrices  $IKK\alpha$  et  $IKK\beta$  possédant un domaine kinase, un domaine de liaison NBD (NEMO Binding Domain) et un domaine de dimérisation LZ (Leucine Zipper), 1 sous-unité catalytique  $IKK\gamma$  (NEMO) (a), et deux sous-unités « outsiders » du groupe;  $IKK\epsilon$  et TBK1 dépourvues du domaine NBD de liaison avec NEMO (b)

#### I.4. Activation NF- $\kappa$ B

Dans la cellule, les complexes NF- $\kappa$ B sont sous forme inactive séquestrés dans le cytoplasme par les différents inhibiteurs décrits précédemment. L'activation de ces facteurs de transcription NF- $\kappa$ B est régulée selon deux voies principales induites par différents stimuli : la voie classique ou canonique et la voie alternative ou non canonique (Hoffmann et al., 2006; Moynagh, 2005) (**Figure 17**).



**Figure 17 : Deux voies principales régulant l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Shao-Cong Sun 2011)**

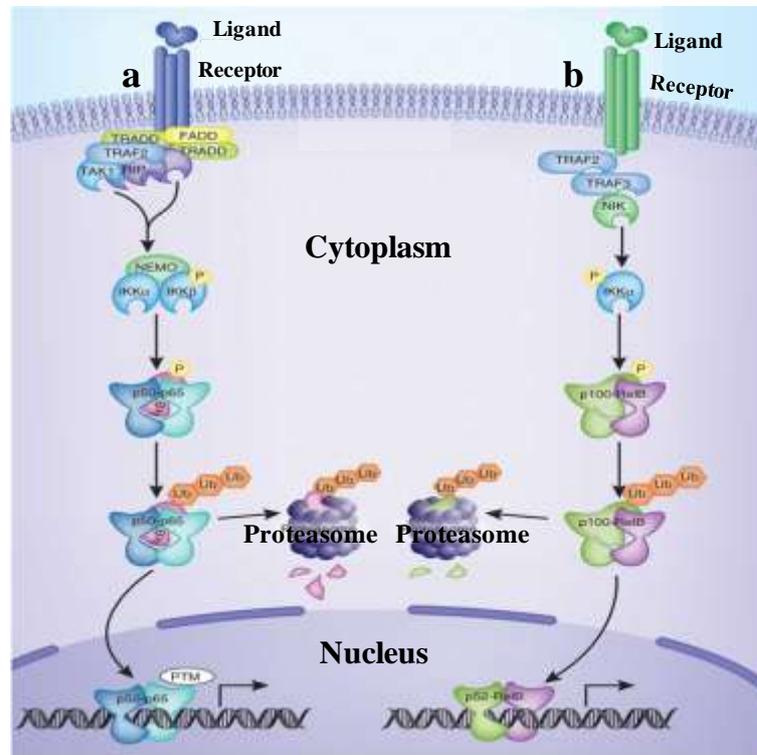
- La voie canonique ou classique est déclenchée par l'activation de nombreux récepteurs comme les TLRs, le TNFR et les récepteurs antigéniques (BCR et TCR)
- La voie non canonique ou alternative est induite par les récepteurs BAFFR, CD40, LT $\beta$ R et RANK

#### **I.4.1. Voie classique (canonique)**

La voie canonique est induite par l'activation d'un certain nombre de récepteurs et stimuli comme des récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires TNFR (TNF receptors) et IL-1R (IL-1 receptors) (Berberich et al., 1994; Israel et al., 1989; Osborn et al., 1989) et par les TLR et les récepteurs antigéniques BCR (B-cell receptor) et TCR (T-cell receptor), et enfin par les dommages causés à l'ADN (Janssens and Tschopp, 2006).

La fixation d'un ligand à son récepteur induit le recrutement des différentes protéines adaptatrices au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur et assurent la transduction du signal. L'événement clef dans l'activation de la voie canonique est la phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  par la kinase IKK (I $\kappa$ B kinase) elle-même phosphorylée par la kinase TAK1. La phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  induit alors son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome 26S (Karin and Ben-Neriah, 2000). La dégradation de l'inhibiteur permet de démasquer et dévoiler le signal de localisation nucléaire des sous-unités NF- $\kappa$ B et ainsi la migration des complexes du cytoplasme vers le noyau. Une fois transloqués, les dimères NF- $\kappa$ B se fixent sur des régions d'ADN spécifiques, appelées sites  $\kappa$ B ou séquences promotrices, et activent ainsi ou répriment les gènes cibles. Les sites  $\kappa$ B sont des séquences consensus dégénérées très variables. La majorité suit la structure suivante :

5'GGGRNWYYCC 3' (G : guanine ; R : adénine ou guanine ; N : n'importe quelle base ; W : adénine ou thymine ; Y : thymine ou cytosine ; C : cytosine). Cette voie d'activation s'applique majoritairement aux complexes RelA/RelA, RelA/p50 et c-Rel/p50 (**Figure 18a**).



**Figure 18 : Voie d'activation classique et alternative de NF-κB (Andrea Oeckinghaus et al ; Nature Reviews/Immunology, 2011)**

- Voie classique: La liaison d'un ligand à son récepteur conduit au recrutement et à l'activation d'un complexe IKK (IKK $\alpha$  et/ou IKK $\beta$ ) et la protéine NEMO. Le complexe IKK activé phosphoryle alors l'inhibiteur I $\kappa$ B conduisant à sa dégradation par le protéasome. NF- $\kappa$ B libre est transloqué vers le noyau pour activer des gènes cibles régulés par les sites  $\kappa$ B.
- Voie alternative: La liaison du récepteur conduit à l'activation de la kinase NIK, qui phosphoryle et active un complexe IKK $\alpha$  qui, à son tour phosphoryle le domaine de la I $\kappa$ B P100 conduisant à la libération du complexe p52/RelB et sa translocation dans le noyau.

#### I.4.2. Voie alternative (non canonique)

La voie alternative est induite par un groupe restreint de récepteurs de la superfamille des TNFR comme le CD40L (CD40 ligand), BAFF (B-cell Activating Factor), LT $\beta$  (Lymphotoxine B), TWEAK (TNF like weak inducer of apoptosis), RANKL (Receptor-Activator of NF- $\kappa$ B Ligand) (Claudio et al., 2002; Saito et al., 2003; Senftleben et al., 2001) ou par la souche bactérienne Gram- *Helicobacter pylori* (Dejardin, 2006). Plus récemment, un récepteur de la famille des CLR, dectine-1, a été identifié comme étant le seul récepteur de sa famille à être capable d'induire la voie NF- $\kappa$ B non canonique en plus de la voie canonique (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

L'association du ligand avec son récepteur active la protéine NIK (NF- $\kappa$ B Inducing Kinase) qui phosphoryle et active le complexe IKK $\alpha$ . En retour, IKK $\alpha$  phosphoryle les sérines présentes dans les répétitions ankyrines de l'extrémité carboxy-terminale de p100 (**Figure 18**). Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitinylation (lysine 48<sup>17</sup>) et la protéolyse partielle de p100 par le protéasome, libérant ainsi les complexes NF- $\kappa$ B contenant la sous-unité RelB qui sont alors transloqués dans le noyau (**Figure 18b**).

Cette voie alternative d'activation de NF- $\kappa$ B est essentiellement mise en jeu lors du développement des organes lymphoïdes et dans le fonctionnement des lymphocytes B (maturation, prolifération cellulaire et survie). Une activation aberrante de cette voie est souvent associée aux tumeurs lymphoïdes (Hayden et al., 2006a; Hayden et al., 2006b).

## II. Différentes cascades de signalisation NF- $\kappa$ B

La signalisation NF- $\kappa$ B met en jeu plusieurs étapes constitutives d'activation et de transduction du signal assurées par de nombreuses protéines adaptatrices, des kinases et des protéines du complexe protéasome. Ces différentes étapes de signalisation ne sont pas complètement connues, mais coopèrent ensemble afin de libérer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B de son inhibiteur. NF- $\kappa$ B libre se transloque dans le noyau pour activer l'expression d'un panel immense de gènes cibles. Les principales étapes de cette signalisation sont illustrées par la **Figure 19** et développées dans les paragraphes suivants.

---

<sup>17</sup> La liaison covalente des ubiquitines se fait au niveau de la lysine 48 (K48) de la protéine. Seul ce type de liaison est reconnu comme signal de dégradation par le protéasome.

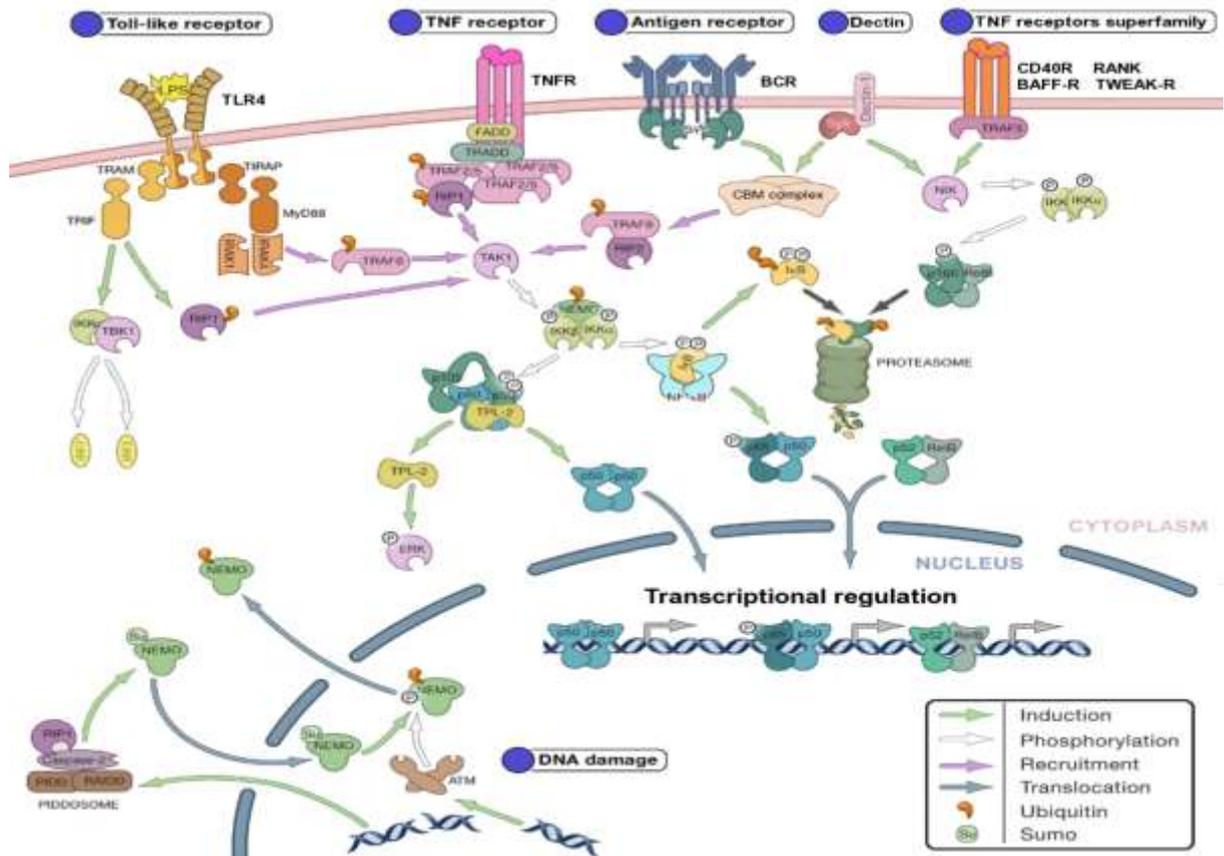


Figure 19 : Principales étapes de la signalisation NF-κB (modifiée d'après Hayden et al., 2006b)

## II.1. Du récepteur vers IKK

La liaison d'un ligand à son récepteur de surface cellulaire déclenche la signalisation et l'activation de la voie NF-κB. Ces premières étapes de transmission du signal recrutent des protéines adaptatrices pour le domaine cytoplasmique du récepteur, en particuliers les protéines des familles RIP (Receptor-Interacting Protein) et TRAF (TNF Receptor Associated Factor). Ces protéines ont des rôles similaires dans les différentes voies d'activation d'IKK ; les voies classique et alternative utilisent les protéines TRAF tandis que les RIP sont requises uniquement lors d'une activation classique.

La famille TRAF comprend quatre membres clairement identifiés comme des intermédiaires pour les stimulations NF-κB. La fixation du TNF-α à son récepteur TNFR1 induit le recrutement de TRAF2 et de TRAF5 par l'intermédiaire du domaine TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain protein). TRAF6 est recruté dans la signalisation *via* les TLR, IL-1R et les TCR/BCR (Hayden et al., 2006a). Enfin, certains récepteurs de la voie alternative recrutent et interagissent avec TRAF3 (Hauer et al., 2005).

Les protéines TRAF2/5/6 de la voie classique recrutent à leur tour les protéines RIP1 et RIP2 qui jouent un rôle majeur dans la signalisation et activation des kinases IKK. RIP1 est

requis dans la signalisation impliquant le récepteur au TNF- $\alpha$  et les TLR utilisant l'adaptateur TRIF (TLR3 et TLR4) (Cusson-Hermance et al., 2005; Hsu et al., 1996; Meylan and Tschopp, 2005). RIP2 est recrutée par la protéine TRAF6 lors des signaux transmis par les récepteurs antigéniques (Ruefli-Brasse et al., 2004).

Une fois RIP1 et/ou RIP2 recrutées, ces dernières recrutent à leur tour la kinase TAK1 (Sato et al., 2005; Shim et al., 2005) qui n'opère que dans les signalisations utilisant RIP (Blonska et al., 2005).

Dans la voie alternative où les RIP sont absentes, la protéine TRAF3 recrute directement la kinase NIK responsable de l'activation d'IKK $\alpha$  (Senftleben et al., 2001; Xiao et al., 2001). Dans la signalisation activée par le récepteur dectine-1, ce n'est pas la protéine TRAF qui est recrutée mais la kinase SYK (Spleen Tyrosine Kinase) chargée d'activation de la kinase NIK et en parallèle le complexe CBM, permettant l'activation classique de NF- $\kappa$ B (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

Il a clairement été établi que la kinase NIK phosphoryle directement IKK $\alpha$  dans la voie alternative, alors que la fonction de la kinase TAK1 dans la voie classique est moins claire (Hacker and Karin, 2006). En effet, TAK1 est indispensable pour l'activation d'IKK lors des signaux d'activation émis par certains récepteurs comme le TNFR. Alors son utilité reste controversée lorsque ces signaux d'activation impliquent les récepteurs antigéniques (BCR et TCR) (Liu et al., 2006; Sato et al., 2005; Wan et al., 2006). De plus, le mode d'action de cette kinase n'est pas clairement établi à savoir si elle assure directement la phosphorylation du complexe IKK ou bien si elle est juste un intermédiaire de cette phosphorylation.

## **II.2. Formation du complexe IKK**

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B par divers signaux extracellulaires emprunte des cascades différentes qui convergent au niveau de la (ou des) protéine(s) kinase(s) responsable(s) de la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ . En 1996, le groupe de *T. Maniatis* a caractérisé un complexe cytoplasmique multiprotéique de 700-900 kDa capable de phosphoryler l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  sur les sérines 32 et 36 en réponse à divers signaux extracellulaires. Ce groupe de protéines appelé le complexe des kinases IKK représente un élément central de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, responsable de la dégradation des inhibiteurs I $\kappa$ B qui séquestrent les dimères NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme.

### II.2.1. Complexe canonique NEMO/IKK $\alpha$ /IKK $\beta$

Dans la voie canonique, le complexe IKK est formé de deux sous-unités catalytiques (IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ ) à activité kinase (Karin and Delhase, 2000) et une sous-unité NEMO à activité structurale et régulatrice du complexe IKK (Rothwarf et al., 1998; Yamaoka et al., 1998). Les protéines IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  possèdent un domaine LZ (Leucine Zipper) (**voir Figure 16**) nécessaire à leur dimérisation et à leur activité kinase. Ces deux protéines sont liées à la protéine NEMO par le domaine NBD (NEMO Binding Domain) (May et al., 2000; Mercurio et al., 1997; Zandi et al., 1997).

L'activation du complexe IKK est le résultat de la phosphorylation d'au moins une de ses sous-unités selon un modèle putatif d'activation proposé par Hayden en 2008 (Hayden and Ghosh, 2008). Les deux sous-unités IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  sont maintenues à l'état inactif par leur liaison à la protéine NEMO. Après la stimulation, cette dernière est recrutée par RIP puis ubiquitinée ce qui provoque un changement de conformation de NEMO. Ce mécanisme permet une autophosphorylation et/ou une phosphorylation de NEMO par la kinase TAK1 (Huang et al., 2003; Tang et al., 2003; Zhou et al., 2004). Une fois les kinases IKK activées, elles phosphorylent les inhibiteurs I $\kappa$ B.

Les kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  phosphorylent les différents types d'I $\kappa$ B avec des affinités différentes. Ces deux kinases phosphorylent préférentiellement I $\kappa$ B $\alpha$  plutôt que I $\kappa$ B $\beta$ , ce qui explique d'ailleurs la différence dans la cinétique de dégradation de ces deux protéines après stimulation (Wu and Ghosh, 2003). IKK $\beta$  est plus efficace que IKK $\alpha$  pour assurer la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et/ou I $\kappa$ B $\beta$ .

### II.2.2. Complexe non canonique IKK $\alpha$ /IKK $\beta$

Dans la voie alternative, le complexe IKK est formé uniquement d'un dimère de IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  qui sont activés par la protéine NIK une kinase cruciale dans la voie non canonique. Cette kinase une fois stabilisée et phosphorylée après une stimulation, assure la phosphorylation directe de l'homodimère IKK $\alpha$  au niveau du domaine kinase, activant ainsi sa fonction. Cette kinase IKK $\alpha$  phosphoryle à son tour les serines présentes dans le domaine C-terminal de la protéine p100, qui se poursuit par la dégradation de cette dernière par le protéasome et la libération du dimère NF- $\kappa$ B. La protéine NIK ne joue pas uniquement un rôle de kinase mais assure aussi un rôle d'adaptateur, nécessaire au recrutement de la kinase IKK $\alpha$  au niveau de p100 (Xiao et al., 2004; Xiao et al., 2001).

### **II.3. Libération de NF- $\kappa$ B de leurs inhibiteurs I $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B se retrouve principalement dans le cytoplasme cellulaire, la régulation de son activité est contrôlée par la famille des protéines I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  et I $\kappa$ B $\epsilon$ ) ou par les précurseurs de la famille NF- $\kappa$ B (p105 et p100), qui sont des inhibiteurs naturels de NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B permet l'inhibition de la translocation nucléaire en masquant la séquence de relocalisation nucléaire de NF- $\kappa$ B. L'inhibition de l'interaction entre I $\kappa$ B et NF- $\kappa$ B est régie par la phosphorylation d'I $\kappa$ B par le complexe IKK. La dégradation de ces inhibiteurs (I $\kappa$ B) intervient plus ou moins rapidement après leur phosphorylation. L'activation de la voie classique conduit à la dégradation des trois protéines I $\kappa$ B et le précurseur p105.

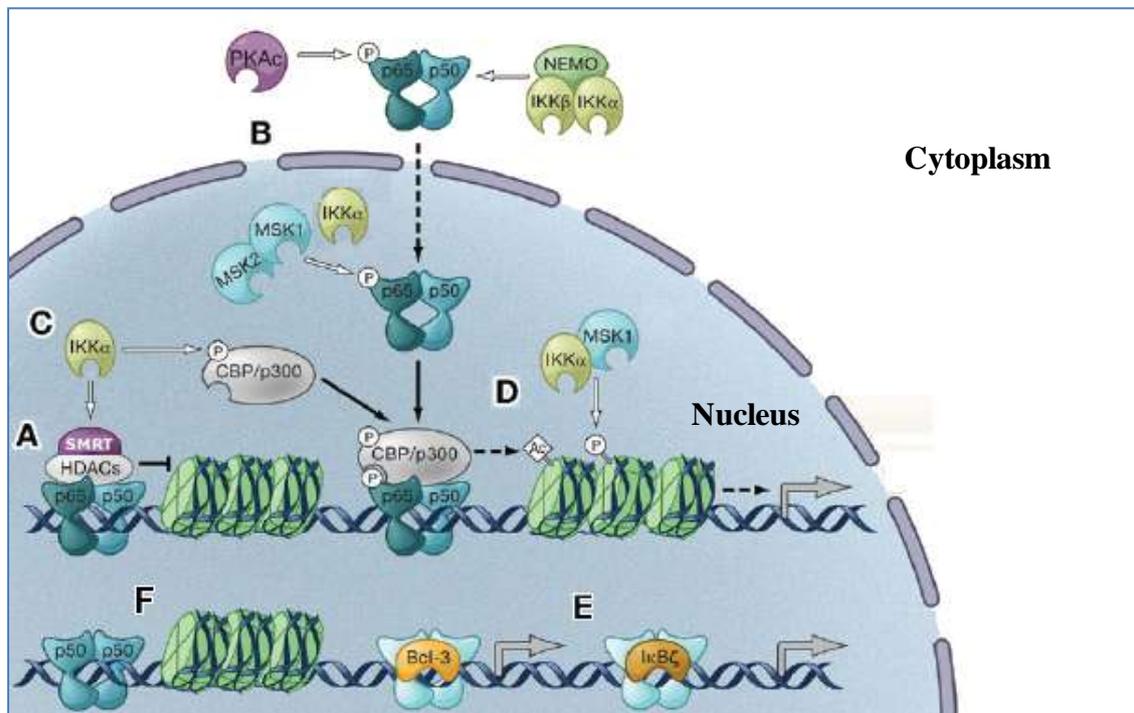
L'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  est rapidement dégradé et permet de libérer les séquences de localisation nucléaire des différents dimères de NF- $\kappa$ B en particulier celle de la sous-unité p65 du dimère p50/p65 la cible primaire. Dans ce dimère, la séquence de localisation nucléaire de p50 reste exposée et couplée à la séquence d'export nucléaire d'I $\kappa$ B $\alpha$  et p65. Ce qui forme un complexe faisant une navette permanente entre le cytoplasme et le noyau en gardant un équilibre dynamique favorisant une localisation cytoplasmique possible (Chen and Ghosh, 1999). La dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  altère drastiquement cet équilibre et favorise une localisation nucléaire du dimère p50/p65 (Ghosh and Karin, 2002). Les autres inhibiteurs I $\kappa$ B $\beta$  et I $\kappa$ B $\epsilon$  sont dégradés moins rapidement que I $\kappa$ B $\alpha$  ce qui induit un décalage temporel sur la cinétique transcriptionnelle NF- $\kappa$ B en réponse à une activation (Hoffmann et al., 2002; Whiteside et al., 1997). Enfin, le précurseur p105 phosphorylé par le complexe IKK classique puis dégradé permet, d'un côté, de libérer les homodimères p50, et de l'autre côté de libérer la kinase TPL-2 (Tumor Progression Locus-2). Cette dernière active ERK et la cascade des MAPK nécessaire à l'activation du facteur de transcription AP-1 (Beinke and Ley, 2004).

Le précurseur p100 est une protéine ubiquitaire impliquée dans les activations classique et alternative de NF- $\kappa$ B. Elle peut agir comme un inhibiteur I $\kappa$ B traditionnel et réguler les dimères contenant p65 dans la voie classique (Basak et al., 2007). Dans la voie alternative, cette protéine est phosphorylée par NIK puis ubiquitinée et dégradée partiellement par le protéasome afin de libérer les sous-unités NF- $\kappa$ B associées comme p52 et RelB.

### **II.4. Translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau et transcription**

La dégradation des inhibiteurs de NF- $\kappa$ B libère et expose la séquence de relocalisation nucléaire des sous-unités NF- $\kappa$ B. Cette séquence permet la translocation de celui-ci du cytoplasme vers le noyau de la cellule (Kolenko et al., 1999; Wang et al., 2002). Une fois que

le complexe NF- $\kappa$ B se trouve dans le noyau. Il subit de nombreuses modifications post-traductionnelles, en particulier, la sous-unité p65 nécessaire pour une interaction efficace avec les séquences cibles et les coactivateurs/ répresseurs transcriptionnels (**Figure 20**).



**Figure 20 : Régulation de l'activité transcriptionnelle dépendante de NF- $\kappa$ B (modifiée d'après Hayden et al., 2006b)**

En absence d'activation (**Figure 20A**), les dimères contenant p65 inactive sont séquestrés par un complexe composé d'un répresseur HDAC (Histone Déacétylase) et d'un co-répresseur la protéine SMRT (Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormon Receptor), ce qui empêche la transcription.

La phosphorylation de p65 au niveau de la sérine 276 par la kinase cytoplasmique PKA (Protéine Kinase A) (**Figure 20B**) ou par les kinases nucléaires MSK1 (Mitogen-and Stress-activated protein Kinase1) et MSK2 favorise son interaction avec des co-activateurs transcriptionnels comme CBP (CREB Binding Protein) et p300 (Zhong et al., 1998). Des mutations au niveau des zones concernées empêchent l'interaction de p65 avec CBP/P300 et par conséquent l'induction de la transcription (Chen et al., 2005). D'autres phosphorylations de p65 sont assurées par IKK $\alpha$ , CK2 (Casein Kinase 2) et PKC $\zeta$  (Protein Kinase C $\zeta$ ) au niveau des sérines 536, 529 et 311 respectivement (Chen and Greene, 2004; Duran et al., 2003; Wang et al., 2000).

La phosphorylation de SMRT (**Figure 20C**) et de CBP permet respectivement l'inactivation du complexe co-répresseur SMRT/ HDAC (Hoberg et al., 2006) et l'association

de CBP à p65 et son activation. Cette phosphorylation de CBP constitue un élément de régulation et de dialogue avec la voie de régulation du cycle cellulaire p53. En effet, p53 et p65 sont en compétition pour cette protéine. CBP non phosphorylée interagit avec p53 favorisant ainsi l'arrêt de la prolifération et l'apoptose. En revanche, CBP phosphorylée a une affinité pour p65, ce qui favorise au contraire la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose (Huang et al., 2007).

L'association du complexe CBP/P300 avec p65 permet son acétylation au niveau de la lysine 310 et une acétylation des histones grâce à la fonction HAT (Histone Acétyl-Transférase) du complexe. Elle provoque ainsi la décompaction de la chromatine et l'activation de la transcription après le recrutement de l'ARN polymérase (**Figure 20D**). La phosphorylation également des histones par IKK $\alpha$  et MSK1 favorise la transcription (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003).

## II.5. Transcription et régulation des gènes cibles

La présence de NF- $\kappa$ B dans le noyau active la transcription des gènes cibles nécessaires à la cellule et entraîne aussi l'activation de synthèse des ARNm codant pour les I $\kappa$ B par un phénomène de rétro-inhibition. Trois I $\kappa$ B atypiques ; Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$  et I $\kappa$ BNS, présents uniquement dans le noyau, agissent sélectivement comme co-activateurs ou co-répresseur de dimères NF- $\kappa$ B spécifiques (**Figure 20E**). Ces trois protéines sont induites d'une manière constitutive en réponse à une stimulation des TLR et régulent la transcription d'un panel de gènes distincts (Medzhitov and Horng, 2009).

Les homodimères des sous-unités p50 et p52 dépourvues du domaine TAD responsable du recrutement de co-activateurs, agissent aussi comme des inhibiteurs transcriptionnels en se fixant sur les éléments de réponse  $\kappa$ B (**Figure 20F**) (Beinke and Ley, 2004). Bcl-3 induit par le TLR4, régule les gènes codant pour le TNF, l'IL-10 et l'IL- $\beta$  en s'associant sur les dimères de p50 et p52 inactifs pour les stabiliser et empêcher ainsi la fixation des dimères actifs contenant un TAD (Carmody and Chen, 2007). Cette protéine permet une régulation positive en provoquant la levée de l'inhibition soit par libération de l'élément de réponse des dimères de p50 inactifs (Hayden and Ghosh, 2004; Perkins and Gilmore, 2006), soit en déclenchant une activité transcriptionnelle (ex du gène la cycline D1) suite à son association au dimère de p52 (Rocha et al., 2003; Westerheide et al., 2001).

I $\kappa$ BNS, induit après stimulation du TLR4, régule négativement les gènes de l'IL-6 et IL-12 en favorisant l'échange des dimères actifs contre leurs homologues inactifs (Medzhitov and Horng, 2009).

I $\kappa$ B $\zeta$  une protéine proche de Bcl-3 est induite en réponse à une activation des TLR. Elle assure une régulation négative en s'associant avec l'homodimère de p50 (co-activateur), et un rôle répresseur sur l'hétérodimère contenant p65 (Motoyama et al., 2005; Yamamoto et al., 2004).

### III. Régulation de la réponse NF- $\kappa$ B et retour à l'homéostasie

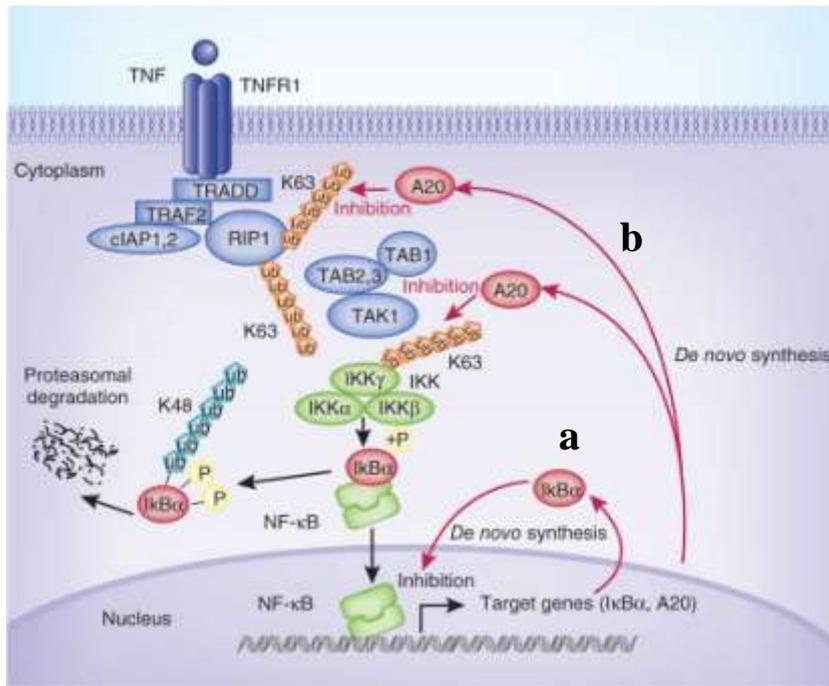
L'activation de la signalisation NF- $\kappa$ B est un phénomène très complexe mais bien régulé dans le temps par de nombreuses boucles d'autorégulation négatives afin d'empêcher une sur-activation présentant des conséquences néfastes sur la physiologie de l'organisme et le développement de certaines pathologies.

#### III.1. Régulation négative de la voie classique

##### III.1.1. Resynthèse d'I $\kappa$ B

Plusieurs études ont montré que les protéines I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\varepsilon$  synthétisées sous contrôle du facteur NF- $\kappa$ B, régulent négativement ce dernier (Kearns et al., 2006; Sun et al., 1993). Nouvellement synthétisée, I $\kappa$ B $\alpha$  entre dans le noyau pour s'associer aux dimères NF- $\kappa$ B fixés sur l'ADN (Arenzana-Seisdedos et al., 1995) et permet ainsi l'export des sous-unités NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme *via* leurs séquences d'export nucléaires.

I $\kappa$ B $\varepsilon$  fournit également une boucle de régulation négative supplémentaire malgré son expression tardive par apport à I $\kappa$ B $\alpha$  (Kearns et al., 2006). Il entre dans le noyau pour inhiber les fonctions NF- $\kappa$ B. La resynthèse des inhibiteurs I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\varepsilon$  constitue une des étapes les plus importantes pour une régulation négative de la voie classique (**Figure 21a**)



**Figure 21: Régulation négative de la signalisation classique NF-κB (Ruland Nature/Immunol, 2011)**

L'activation de la voie NF-κB induit l'expression de plusieurs gènes incluant ceux codant pour des régulateurs négatifs comme A20 et IκBα.

- La protéine IκBα nouvellement synthétisée se lie aux dimères NF-κB nucléaires et inhibe leur fonction en faisant des navettes de NF-κB dans le cytoplasme.
- L'enzyme déubiquitineuse A20 permet la déubiquitination de RIP1 et IKKγ.

### III.1.2. Déubiquitinases en amont d'IKK

Plusieurs enzymes déubiquitinases DUB (Ubiquitin-Binding Domain) synthétisées sous contrôle de NF-κB, constituent un point critique impliqués dans la régulation négative de la voie classique (Wertz and Dixit, 2010).

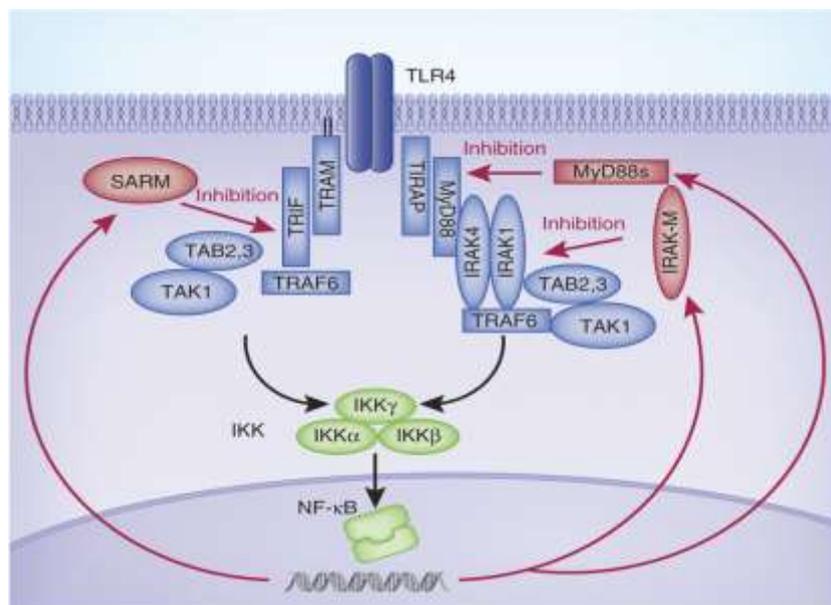
A20 est l'une des déubiquitinases la plus étudiée (Lee et al., 2000), en plus de sa région déubiquitineuse, possède un doigt de zinc C2-C3 avec une ubiquitine ligase E3 permettant une double fonction déubiquitination-ligation (Wertz et al., 2004). Lors d'une signalisation médiée par le TNFR, l'enzyme A20 activée, déubiquitine les chaînes polyubiquitines K63-liées de l'adaptateur RIP1 qui déstabilise le complexe IKK. Grâce à son domaine E3 ligase, A20 induit une K48-polyubiquitination et la dégradation de RIP1 par le protéasome, et inhibe la transduction du signal (**Figure 21b**). Cette activité de A20 n'est pas sélective pour RIP1, mais vise aussi d'autres activateurs IKK comme TRAF6 (Boone et al., 2004), IKKγ (Mauro et al., 2006; Wagner et al., 2008) et RIP2 (Hitotsumatsu et al., 2008). Ainsi, A20 régule négativement les cascades de signalisation activées par les récepteurs TLR ou les récepteurs antigéniques (Hymowitz and Wertz, 2010).

Cezanne une protéine à doigt de zinc anti-NF- $\kappa$ B, un membre de la famille A20, est une autre enzyme DUB qui atténue la voie NF- $\kappa$ B (Enesa et al., 2008). Dans la signalisation par le TNFR, la protéine Cezanne réprime l'accumulation des protéines RIP1 polyubiquitinilées ce qui permet par conséquent une régulation négative de l'activation NF- $\kappa$ B.

CYLD (cylindromatosis), troisième enzyme DUB, permet une déubiquitination d'une large gamme d'activateurs NF- $\kappa$ B comme TRAF2, TRAF6, TAK1 et IKK $\gamma$  (Sun, 2010; Trompouki et al., 2003), favorisant un contrôle négatif de l'activation NF- $\kappa$ B induite par le TNF, TLR2 et TLR4 (Kovalenko et al., 2003; Sun, 2010).

### III.1.3. Dissociation des complexes de signalisation

Un autre mécanisme spécifique de régulation négative des réponses NF- $\kappa$ B est la présence des adaptateurs dominants négatifs (**Figure 22**). Ces mécanismes sont mieux caractérisés dans la régulation de MyD88 et TRIF des voies dépendantes des TLR (Kawai and Akira, 2010). Ainsi, l'isoforme court MyD-88s (Short MyD-88) dépourvue du domaine intermédiaire d'interaction avec TIR et IRAK4 et synthétisée en quantité importante à la suite d'une stimulation des cellules par le LPS, interfère dans l'interaction de MyD-88 avec IRAK4 (Burns et al., 2003).



**Figure 22 : Régulation de la signalisation classique NF- $\kappa$ B par les adaptateurs de dominants négatifs (Jürgen Ruland; Nature Reviews/Immunology, 2011)**

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B induit l'expression de l'isoforme court MyD-88s, la kinase inactive IRAK-M et le régulateur négatif l'adaptateur SARM. Ces dominants négatifs affectent et altèrent la stabilité des complexes IKK actifs.

IRAK-M un homologue inactif de IRAK induit après une stimulation TLR (Escoll et al., 2003) est une autre protéine qui interfère avec la formation du complexe IRAK/TRAF6 et inhibe l'activation NF- $\kappa$ B. Les cellules déficientes pour IRAK-M produisent une forte concentration de cytokines (Kobayashi et al., 2002) et l'induction IRAK-M est associée à une tolérance au LPS dans le modèle humaine d'endotoxémie<sup>18</sup> (van 't Veer et al., 2007).

Un troisième exemple d'un adaptateur dominant négatif dans la signalisation des TLR est la protéine SARM contenant un domaine TIR (Carty et al., 2006). Cette protéine inhibe sélectivement la voie des TRIF par une interaction directe avec la protéine TRIF ce qui interfère probablement avec la stabilité du complexe effecteur TRIF.

Bien que les fonctions des adaptateurs dominants négatifs dans les signalisations indépendantes des TLR soient moins connues, il est très probable que de telles molécules contribuent aussi à la régulation de l'activité des complexes IKK-NF- $\kappa$ B.

Dans la signalisation activée par le récepteur antigénique des lymphocytes T (TCR), la kinase CK1 $\alpha$  (Casein Kinase 1 $\alpha$ ) module positivement et négativement la voie NF- $\kappa$ B en permettant à la fois l'initiation et la terminaison de l'activation (Bidere et al., 2009). Après une stimulation antigénique du récepteur, CK1 $\alpha$  engage un complexe actif (CARD11-Bcl-10-MALT1) par une interaction directe avec CARD11 pour initier l'activation NF- $\kappa$ B. Alors, CK1 $\alpha$  phosphoryle CARD11 pour inhiber la signalisation. Le mécanisme de cette inhibition n'est pas bien clair, mais il a été suggéré que cette phosphorylation par CK1 $\alpha$  pourrait contribuer à la dégradation de CARD11 (Bidere et al., 2009).

#### III.1.4. Terminaison de la réponse NF- $\kappa$ B classique dans le noyau

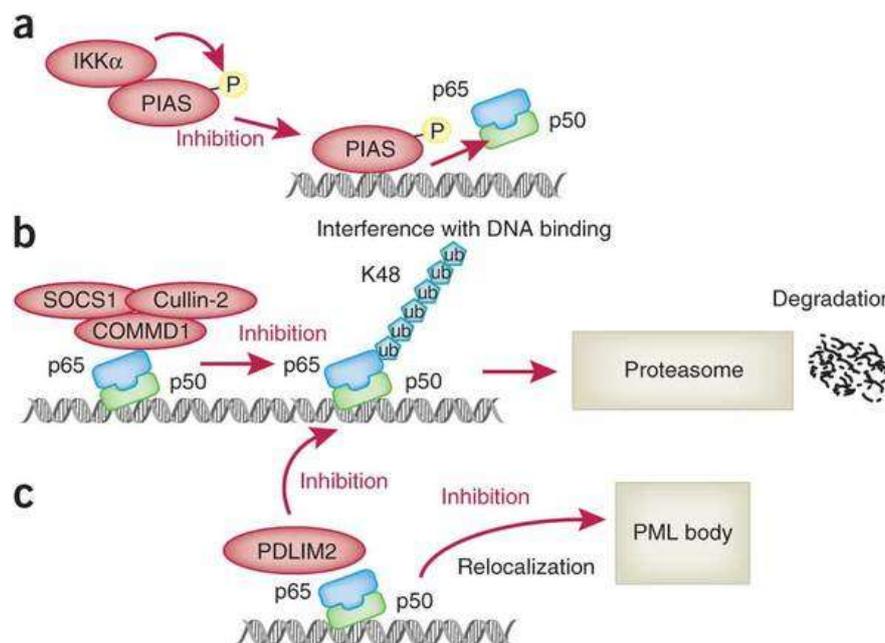
Bien que le transport des sous-unités NF- $\kappa$ B du noyau vers le cytoplasme soit important pour la terminaison de la réponse NF- $\kappa$ B, plusieurs mécanismes supplémentaires de contrôle négatif s'opèrent dans le noyau (**Figure 23**). Ceux-ci incluent le détachement de NF- $\kappa$ B actif de l'ADN et la dégradation protéolytique des dimères NF- $\kappa$ B actifs. Après l'observation initiale que les souris déficientes pour les SUMO E3 ligase, PIAS1 (Protein Inhibitor of Activated STAT1) ou PIAS4, sont plus sensibles au choc septique induit par le LPS (Liu et al., 2004), il a été montré que PIAS1 et PIAS4 interfèrent directement avec la fixation du dimère RelA à l'ADN (**Figure 23a**) (Liu et al., 2004; Liu et al., 2005). La PIAS1

---

<sup>18</sup> La présence d'endotoxines dans la circulation sanguine, qui, s'ils sont issus des bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnets, déclenchent une cascade pathophysiologique de médiateurs pro-inflammatoire qui peut entraîner des hémorragies, nécroses des reins.

inhibe l'expression d'I $\kappa$ B $\alpha$  et du précurseur de l'IL-8 induit par le TNF, tandis que PIAS4 inhibe l'expression de la chemokine CXCL1 (Liu et al., 2005; Tahk et al., 2007).

IKK $\alpha$  aussi exerce une régulation négative dans la terminaison de la réponse NF- $\kappa$ B dans le noyau en accélérant le turnover de RelA et c-Rel (Lawrence et al., 2005; Liu et al., 2007). IKK $\alpha$  phosphoryle RelA au niveau de la serine 36, améliorent ainsi sa dégradation tardive par le protéasome.



**Figure 23 : Régulation négative de la fonction NF- $\kappa$ B dans le noyau (Jürgen Ruland; Nature Reviews/Immunology, 2011)**

- a. Après phosphorylation par IKK $\alpha$ , PIAS1 interfère la fixation des complexes RelA-NF- $\kappa$ B à l'ADN
- b. Le complexe EC2S (SOCS1-Cullin-2-COMMD1) E3 ubiquitine ligase et PDLIM2 E3 ligase (c) permettent la terminaison de la réponse RelA-NF- $\kappa$ B dans le noyau par polyubiquitination de RelA et sa dégradation par le protéasome.
- c. PDLIM2 assure la relocalisation nucléaire de RelA au niveau des régions de transcription silencieuse

Au moins deux ubiquitines ligases E3 ; le complexe EC2S et PDLIM2 contrôlent la dégradation ou la localisation de RelA nucléaire (Natoli and Chiocca, 2008). Le complexe EC2S formé de SOCS1, Cullin-2 et COMMD1 permet l'ubiquitination et la dégradation de RelA par le protéasome. Ceci induit la terminaison des réponses NF- $\kappa$ B aux derniers stades de stimulation cellulaire (Maine et al., 2007). PDLIM2 favorise également la dégradation de RelA par le protéasome grâce son domaine PDZ (Postsynaptic Density 65-discs large-Zonula occludens 1) recrutant la ligase E3 (**Figure 23b**). Ainsi, PDLIM2 assure une relocalisation nucléaire de RelA et la liaison aux régions ADN de transcriptions silencieuses (**Figure 23c**).

Finalement Set9, une lysine méthyltransférase, permet la méthylation de RelA pour initier sa dégradation par le protéasome probablement après le recrutement d'une ligase E3 (Yang et al., 2009).

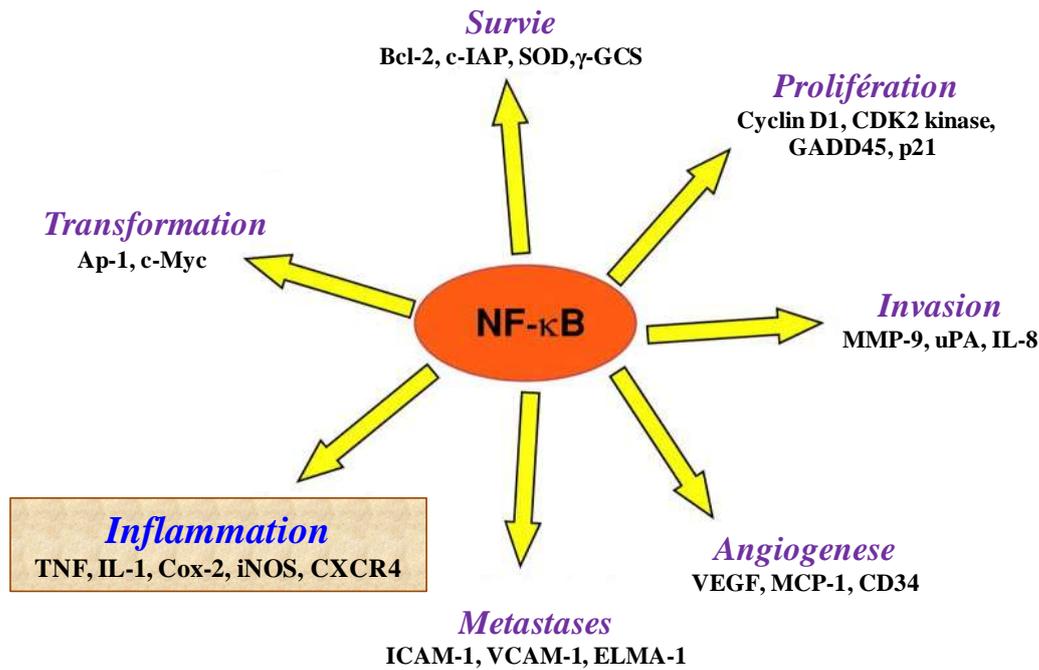
### III.2. Régulation négative de la voie alternative

Des études ont montré que des souris déficientes pour les adaptateurs TRAF3 et TRAF2 de la kinase NIK avaient une activation constitutive de NIK, ce qui résultait en une inflammation périnatale et une mortalité précoce (Vallabhapurapu et al., 2008; Yeh et al., 1997). Les mécanismes de régulation négative de la voie alternative commencent uniquement à être élucidés. IKK $\alpha$  permet d'atténuer le signal assurant la stabilisation de NIK, et vraisemblablement va contrôler la cinétique des voies NIK-dépendantes (Razani et al., 2010). Après le début d'activation par NIK, IKK $\alpha$  permet la phosphorylation de l'extrémité C-terminale de NIK et cause sa déstabilisation, puis sa dégradation par le protéasome (Razani et al., 2010).

Ces 25 dernières années ont permis de décrypter en partie les différentes étapes de la signalisation NF- $\kappa$ B, mais de nombreuses questions restent malgré tout en suspens. La régulation des différents dimères, le rôle exact de l'ubiquitination fonctionnelle dans la régulation des composants de la signalisation, ainsi que les mécanismes et les conditions contrôlant l'activation et la terminaison de la transcription sont autant de points à éclaircir.

### IV. Gènes cibles de NF- $\kappa$ B

Les gènes induits par NF- $\kappa$ B varient d'un type cellulaire à l'autre. NF- $\kappa$ B induit une réponse cellulaire conduisant à l'expression de nombreux gènes régulant notamment la survie cellulaire, la prolifération, l'apoptose et l'inflammation (**Figure 24**).



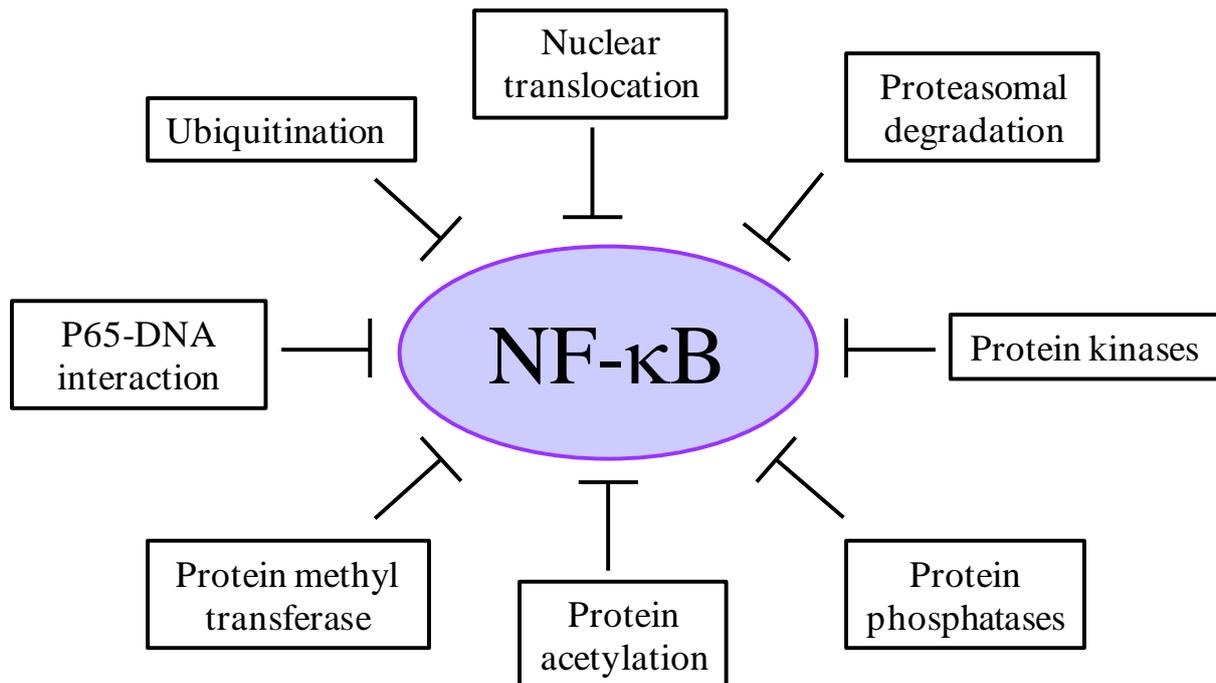
**Figure 24 : Quelques gènes cibles du facteur de transcription NF-κB (Prasad et al., Mol Cell Biochem 2010)**

Plus de 500 gènes cibles de NF-κB ont été identifiés. Nous ne présenterons ici qu'une partie des gènes induits par le facteur de transcription NF-κB. Ce dernier intervient dans l'inflammation en régulant des gènes majeurs de la réponse inflammatoire comme le TNF $\alpha$ , les interleukines IL-6 et IL-8 (Kang et al., 2007; Son et al., 2008). NF-κB est connu pour contrôler l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire comme les cyclines D1, D2 et CDK6 (Cyclin Dependante Kinase 6) (Iwanaga et al., 2008; Toualbi-Abed et al., 2008). Il a également été identifié comme cible des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et A20 (Catz and Johnson, 2001; Krikos et al., 1992). Des facteurs angiogéniques ont été établis comme cible de NF-κB comme VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Chilov et al., 1997). NF-κB joue aussi un rôle dans le phénomène d'invasion et de métastase en induisant notamment l'expression des protéines MMP-9 (Matrix MetalloProteinase 9) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) (Iademarco et al., 1992; Yan et al., 2004).

## V. Inhibition de l'activation NF-κB par de petites molécules

La voie NF-κB est souvent constitutivement active chez les patients avec des pathologies inflammatoires chroniques comme le cancer, l'arthrite rhumatoïde, l'asthme et de nombreuses maladies auto-immunes (Sethi et al., 2008). Comme décrit précédemment, NF-κB contrôlant de multiples gènes impliqués dans une liste non exhaustive de maladies humaines ce qui fait

que cette voie est une cible thérapeutique intéressante (Karin et al., 2004; Nagashima et al., 2006). En raison des différents niveaux de régulation, il a été montré que NF- $\kappa$ B est la cible potentielle de nombreux composés anti-inflammatoires (Barnes and Karin, 1997). Ces derniers peuvent agir et cibler différents acteurs de la signalisation incluant les acteurs des étapes cytoplasmiques comme les kinases, phosphatases, ubiquitinasés et les étapes nucléaires comme la translocation, la liaison à l'ADN, acétylation/déacétylation et la méthylation (Figure 25).



**Figure 25 : Cibles potentielles pour l'inhibition de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Gupta SC. et al., Biochimica et Biophysica Acta 2010)**

Conformément à son implication dans des pathologies humaines et du fait que de nombreuses molécules interfèrent avec sa signalisation, la voie NF- $\kappa$ B est une cible extrêmement attrayante au développement thérapeutique. A ce jour, plus de 700 molécules incluant des antioxydants, des peptides, des petits ARN et/ou ADN, des petites molécules et des protéines virales et/ou microbiennes ont été décrites pour inhiber l'activation de cette voie (Gupta et al., 2010). Plusieurs de ces molécules agissent comme des inhibiteurs généraux de l'activation NF- $\kappa$ B, pendant que d'autres visent des étapes spécifiques ou multiples de la signalisation.

Il a été rapporté que plusieurs composés anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdes NSAIDS (Non Steroid Anti Inflammatory Drugs) et les immunosuppresseurs bloquent l'activation de la voie NF- $\kappa$ B.

Les glucocorticoïdes tels que dexaméthasone, prednisone et méthylprednisolone, qui sont communément utilisés comme des molécules anti-inflammatoires, inhibent fortement l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par des mécanismes qui ne sont pas complètement élucidés mais probablement incluent la liaison à l'ADN ainsi que l'activité d'IKK et des transactivateurs (De Bosscher et al., 2006).

Les NSAIDs comme le sodium salicylate (l'aspirine) et le sulindac répriment l'activation NF- $\kappa$ B en inhibant la phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  (McDade et al., 1999; Yamamoto et al., 1999). A des fortes concentrations, l'aspirine a été montrée pour bloquer l'activité NF- $\kappa$ B en se liant directement à la kinase IKK $\beta$  et inhibant son activité (Yin et al., 1998). Plus récemment, il a été démontré que l'aspirine inhibe aussi l'activité du protéasome (Dikshit et al., 2006).

Plusieurs immunosuppresseurs sont connus pour bloquer et inhiber la voie NF- $\kappa$ B par des mécanismes mettant en jeu l'inhibition de la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (Meyer et al., 1997) ou la modulation de sa liaison à l'ADN et donc son potentiel de transactivation (McCaffrey et al., 1994; Qiu et al., 1999).

A cette liste de composés anti-inflammatoires utilisés pour le traitement de certaines pathologies inflammatoires, se rajoute une liste non exhaustive de petites molécules capables d'inhiber l'activation NF- $\kappa$ B. Certaines de ces dernières sont validées uniquement *in vitro* mais d'autres ont été validées *in vivo*. Quelques mécanismes d'action de ces molécules sont totalement dévoilés tandis que d'autres ne le sont pas encore (Gupta et al., 2010).

Certains virus ont développé des mécanismes variés conduisant à l'inhibition de l'activation NF- $\kappa$ B (Hiscott et al., 2006). La protéine A238L du virus ASFV (African Swine Fever Virus) mimant l'inhibiteur I $\kappa$ B peut interagir d'une manière stable avec la sous unité RelA pour inhiber l'activation NF- $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$  ou par l'IFN $\gamma$  (Revilla et al., 1998). De même, la protéase 3C du poliovirus clive la sous-unité RelA et réduit la signalisation NF- $\kappa$ B (Neznanov et al., 2005). En plus, plusieurs virus possèdent des adaptateurs ou des petites protéines qui inhibent l'activité d'IKK (Hiscott et al., 2006). La protéine MC160 de *Molluscum contagiosum* (Nichols and Shisler, 2006) et la protéine non structurale 5B du virus de l'hépatite C (Choi et al., 2006) spécifiques de la protéine IKK $\alpha$ , inhibent la voie NF- $\kappa$ B non canonique.

Il a été montré que la Gliotoxine produite par le champignon *Aspergillus fumigatus* inhibe la voie NF- $\kappa$ B activée en bloquant la dégradation de la protéine I $\kappa$ B (Pahl et al., 1996). La molécule panepoxydone synthétisée par *Lentinus crinitus* inhibe aussi la voie NF- $\kappa$ B.

La protéine YopJ codée par la bactérie *Yersinia pseudotuberculosis*, inhibe la voie NF- $\kappa$ B en prévenant la phosphorylation et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Schesser et al., 1998). Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que YopJ se lie directement avec IKK $\beta$  (Orth et al., 1999). La protéine AvrA de *Salmonella typhimurium* inhibe également l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par des mécanismes différents de ceux de la protéine YopJ (Collier-Hyams et al., 2002). Des petits composés comme le 5,6 epoxy cyclohexenone synthétisé par *Amycolatopsis*, et la cycloepoxydone affectent l'activation NF- $\kappa$ B à différentes étapes de la signalisation (Umezawa et al., 2000).

Ces différents composés aux effets inhibiteurs de la voie NF- $\kappa$ B ne sont pas uniquement restreints aux bactéries pathogènes. Il existe aussi plusieurs petits composés synthétisés et produits par des bactéries commensales ou par des probiotiques, et qui ont comme cible la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. L'étude de Sokol en 2008 a montré que le surnageant de la bactérie commensale *Faecalibacterium prausnitzii* isolée du tractus digestif avait un effet inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B activée par IL-1 $\beta$  dans les colonocytes intestinales humaines les Caco-2. D'autres métabolites bactériens de nature inconnue, et qui sont produits par des probiotiques exercent également des effets inhibiteurs sur la voie NF- $\kappa$ B. *Lactobacillus fermentum* secrète un métabolite dans le surnageant de culture qui inhibe la voie NF- $\kappa$ B activée suite à une infection par la bactérie pathogène *Yersinia enterocolitica* en diminuant la sécrétion de la cytokine proinflammatoire IL-8 dans les cellules HeLa (Frick et al., 2007b). *Bifidobacterium breve* C50 (*Bb*) secrète un petit composé soluble capable de diminuer l'activation de la voie NF- $\kappa$ B en bloquant la phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B (Heuvelin et al., 2009).

## VI. NF- $\kappa$ B dans l'intestin : de l'homéostasie à l'inflammation

La voie NF- $\kappa$ B a été impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires. Une augmentation de l'activation de cette voie est souvent détectée dans des tissus avec une inflammation chronique où les médiateurs pro-inflammatoires sont exprimés en excès ce qui provoque ainsi des dommages tissulaires. Ces conclusions ont suggéré que la voie NF- $\kappa$ B a des fonctions importantes dans le maintien de l'homéostasie immunitaire et la prévention de maladies inflammatoires dans plusieurs tissus. Cette fonction bénéfique de NF- $\kappa$ B a été essentiellement remarquée dans les cellules épithéliales où la voie NF- $\kappa$ B exerce un rôle particulièrement important pour le maintien de l'homéostasie immunitaire dans les tissus épithéliaux. Il semble donc que la voie NF- $\kappa$ B affiche une double fonction dans

l'inflammation chronique. D'une part, une augmentation de l'activation de cette voie induit une inflammation et des dommages tissulaires, mais d'autre part, l'inhibition de NF- $\kappa$ B peut aussi perturber l'homéostasie immunitaire, en déclenchant ainsi une l'inflammation et des maladies.

## **VI.1. NF- $\kappa$ B et le maintien de l'homéostasie intestinale**

Une ablation totale de composants de la voies NF- $\kappa$ B cause la mort embryonnaire des souris, ce qui exclut toute possibilité d'étudier les conséquences de ses mutations sur un organe mature comme le tube digestif (Beg et al., 1995a; Beg et al., 1995b; Lee et al., 2000; Li et al., 2000). Des nouvelles approches de génie génétique permettant d'obtenir de façon spécifique, des souris invalidées<sup>19</sup> pour l'expression des gènes dans un tissu donné ou à des stades précis du développement, ont permis de palier à cet obstacle et d'étudier les effets des mutations de la voie NF- $\kappa$ B.

De nombreuses études utilisant ces modèles de souris invalidées pour une ou plusieurs protéines clefs de la signalisation NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales intestinales, ont démontré le rôle crucial de cette voie dans le maintien de l'homéostasie épithéliale.

### **VI.1.1. Rôle de NF- $\kappa$ B dans l'homéostasie physiologique**

Le rôle protecteur de NF- $\kappa$ B dans l'homéostasie de la physiologie intestinale a été décrit grâce à de nombreuses études. Il a été démontré que les souris déficientes pour NEMO, la sous-unité régulatrice du complexe IKK, dans les cellules épithéliales intestinales IECs (Intestinal Epithelial cells) développent une colite chronique sévère. Cette dernière est caractérisée par une ulcération épithéliale, une expression élevée des médiateurs pro-inflammatoires et une infiltration des cellules immunitaires (Nenci et al., 2007). Cependant, une ablation spécifique de IKK $\alpha$  ou IKK $\beta$  seul dans ces cellules (IECs) ne provoque pas de pathologies intestinales de façon spontanée. En revanche, les souris délétées pour les deux IKK dans l'épithélium intestinal ont développé des colites sévères semblables aux souris NEMOIEC-KO (Nenci et al., 2007). Ces études montrent que l'activation de la voie canonique IKK/NF- $\kappa$ B a des fonctions importantes et indispensables pour l'homéostasie de l'épithélium colique (Nenci et al., 2007). Ces observations sont soutenues par d'autres études ultérieures sur des souris dépourvues de la kinase TAK1 dans les IECs, qui ont montré que les souris TAK1IEC-KO développent d'une manière spontanée une inflammation intestinale (Kajino-Sakamoto et al., 2008). Les souris NEMOIEC-KO comme les souris TAK1IEC-KO

---

<sup>19</sup> Communément appelée souris KO (Knock-Out) obtenues par élimination purement et simplement d'un gène ou plus.

présentent une augmentation de l'apoptose des IECs, suggérant qu'une ablation de NEMO ou de TAK1 sensibilise les IECs à l'apoptose (Kajino-Sakamoto et al., 2008; Nenci et al., 2007), une notion qui souligne le rôle et la fonction importante de NF- $\kappa$ B dans la survie cellulaire.

Le rôle important de la signalisation NF- $\kappa$ B/NEMO-dépendante dans le maintien de l'homéostasie intestinale est aussi supporté par des études sur des patients porteurs de mutations sur le gène NEMO. Ces patients souffrent d'immunodéficience sévère, et certains d'entre eux développent une colite (Pai et al., 2008; Smahi et al., 2002). La signalisation NEMO/IKK-dépendante dans les cellules épithéliales contrôle donc l'homéostasie immunitaire intestinale chez les souris et chez les humains.

Par ailleurs, la perte d'une seule des deux sous-unités du complexe IKK ou de la sous-unité RelA, bien que ne provoquant pas l'apparition spontanée de colites, sensibilise les souris aux colites expérimentales (Eckmann et al., 2008; Greten, 2004; Steinbrecher et al., 2008; Zaph et al., 2007). Ces observations suggèrent que l'épithélium intestinal doit être capable d'activer NF- $\kappa$ B afin de réparer les dommages tissulaires.

#### **VI.1.2. NF- $\kappa$ B et l'infection par les micro-organismes pathogènes**

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales protège aussi la muqueuse intestinale contre l'infection par des micro-organismes pathogènes. Zaph et ces collaborateurs ont constaté que les souris IKK $\beta$ IEC-KO présentaient une dérégulation des réponses immunitaires suite à une infection par le parasite intestinal « *Trichuris muris* ». Ils ont suggéré que l'expression épithéliale de NF- $\kappa$ B orchestre les réponses immunes mucosales en régulant la production de cytokines immunomodulatrices essentielles comme TSLP (Thymic Stromal Lymphopoitin) dans l'épithélium. Cela souligne que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les IECs, en plus de ses effets intrinsèques sur la cellule, exerce aussi des effets paracrines cruciaux sur les cellules du système immunitaire mucosal.

L'expression de TSLP dans les cellules épithéliales est sous le contrôle de NF- $\kappa$ B (Lee and Ziegler, 2007; Liu et al., 2007). Cette cytokine agit sur les CD en inhibant leur sécrétion d'IL-12 induite en réponse aux infections bactériennes, ce qui bloque leur potentiel inflammatoire et l'induction d'une réponse de type Th1 (Rimoldi et al., 2005). L'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales a donc une fonction immunorégulatrice de la réponse immunitaire adaptative. Ces observations tiennent aussi pour une partie dans l'estomac, depuis qu'une étude récente a montré que les souris délétées pour IKK $\beta$  dans les cellules

épithéliales gastriques, souffrent d'une inflammation gastrique sévère induite par *Helicobacter* par rapport aux souris sauvages (Shibata et al., 2010).

D'autres études sur des modèles de souris ont révélé que la signalisation MyD88 a un rôle protecteur comparable à celui de NF- $\kappa$ B dans l'intestin. Les souris déficientes pour MyD88 sont protégées contre une colite dans le modèle de souris *IL-10*<sup>-/-</sup> aussi bien que chez les souris NEMO<sup>IEC-KO</sup> (Nenci et al., 2007; Rakoff-Nahoum et al., 2006). Ces observations montrent que la signalisation MyD88 exerce des effets colitogéniques préjudiciables dans ces modèles. Par ailleurs, les souris MyD88<sup>-/-</sup> sont hypersensibles à la colite induites au DSS (Sulfate de Dextran Sodique) (Araki et al., 2005; Rakoff-Nahoum et al., 2004), ce qui suggère aussi un rôle protecteur essentiel de MyD88 pour l'intestin. Une étude récente a montré que la signalisation MyD88 dans les cellules épithéliales est critique pour la survie de l'hôte en absence d'immunité adaptative (Asquith et al., 2010).

L'augmentation de la susceptibilité des souris MyD88<sup>-/-</sup> ou TLR4<sup>-/-</sup> à la colite induite au DSS est associée à une augmentation de l'apoptose des IECs (Fukata et al., 2005), suggérant ainsi un rôle cytoprotecteur intrinsèque de la signalisation MyD88 induite par le TLR4 dans les IECs. A cet égard, l'activation du TLR4 induit l'expression de la Cyclo-Oxygénase 2 (COX2) qui joue un rôle important dans la protection des IECs de l'apoptose pendant la colite au DSS.

De plus, la perte de MyD88 et du TLR4 chez les souris induit une augmentation de la translocation bactérienne dans l'épithélium intestinal après l'administration du DSS (Fukata et al., 2005). Cela indique que le contrôle de l'expression des gènes de peptides antimicrobiens médié par MyD88 pourrait être un second effet intrinsèque bénéfique de la voie NF- $\kappa$ B dans les IECs. Effectivement, les peptides antimicrobiens produits par les IECs sont souvent induits par la signalisation MyD88 et ils sont importants pour protéger l'hôte contre les bactéries menaçant d'envahir la muqueuse (Brandl et al., 2007; Vaishnava et al., 2008).

Les effets de certains TLR sur l'homéostasie intestinale chez la souris ont aussi été étudiés. Le TLR2 a été montré réguler l'expression des protéines de jonctions serrées et de l'adhésion cellulaires dans les IECs (Cario et al., 2007). Ceci suggère que la signalisation MyD88 pourrait prévenir l'inflammation intestinale excessive en régulant la formation d'une barrière épithéliale intégrée. En plus, la stimulation du TLR9 apical pourrait prévenir l'activation excessive de NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales, et la perte de ce récepteur sensibilise d'avantage les souris à la colite induite au DSS (Lee et al., 2006). La délétion du TLR5, senseur de la flagelline et activateur de NF- $\kappa$ B, provoque des colites spontanées

(Vijay-Kumar et al., 2007). Ces données indiquent que la stimulation du TLR5 par les bactéries commensales flagellées est importante pour maintenir l'homéostasie intestinale. Ces observations illustrent les fonctions bénéfiques des TLR dans l'épithélium intestinal (Lee et al., 2006).

L'ensemble des études décrites précédemment montre que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dépendante de MyD88 dans les IECs induit des effets bénéfiques pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Par ailleurs, une étude récente décrivant une inflammation spontanée de l'intestin grêle chez les souris exprimant la protéine du dominant négative de MyD88 d'une manière sélective dans les IECs, soutient ce rôle bénéfique (Gong et al., 2010).

L'un des aspects importants de MyD88 est que cet adaptateur n'est pas seulement impliqué dans la signalisation des TLR, mais est aussi impliqué dans la signalisation induite par les cytokines de la famille de l'IL-1. Ces cytokines ont été impliquées dans la régulation de l'inflammation intestinale. Les souris déficientes pour un composé indispensable de l'inflammasome qui ne peuvent produire d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 actives, sont hypersensibles à la colite induite au DSS (Allen et al., 2010; Zaki et al., 2010). Bien que les réponses à IL-1 $\beta$  ou à IL-18 améliorent la susceptibilité à la colite induite au DSS (Lebeis et al., 2009; Salcedo et al., 2010), l'IL-18 a été identifié comme une cytokine importante qui protège les souris de l'inflammation intestinale (Dupaul-Chicoine et al., 2010; Zaki et al., 2010).

### VI.1.3. NF- $\kappa$ B et dommages tissulaires

La voie NF- $\kappa$ B exerce également des effets bénéfiques sur les dommages du tissu intestinal causés par les irradiations<sup>20</sup>. Ces radiations ont pour effet d'endommager les tissus à forte prolifération cellulaire ; les fortes doses tuent les cellules souches des cryptes, et causent une inflammation. Dans ces conditions, la mort des cellules épithéliales intestinales n'est pas uniquement due aux effets des irradiations, mais aussi à une apoptose induite en réponse à ces radiations.

Les souris invalidées pour IKK $\beta$  présentent une forte apoptose des IECs après une exposition à des radiations par rapport aux souris sauvages. De plus, cette augmentation de l'apoptose est corrélée négativement avec l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bcl-xl contrôlées par la voie NF- $\kappa$ B (Egan et al., 2004).

Il a été montré que l'activation du TLR5 par un peptide dérivé de la flagelline de *Salmonella* (CBLB502) protège des dommages cellulaires causés par les irradiations dans

---

<sup>20</sup> Les radiations sont utilisées comme traitement thérapeutique des cancers pour bloquer la prolifération des cellules tumorales. Les irradiations les plus utilisées sont les rayonnements X à haute énergie

des modèles de souris et de singe. Ces observations se traduisaient par une amélioration de la survie des animaux, obtenue par une inhibition de l'apoptose des IECs. Cette activation du TLR5 était accompagnée de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et par conséquent de l'activation de gènes cibles codant notamment pour SOD2 (Superoxyde Dismutase 2) et G-CSF (Gralunocyte Colony-Stimulating Factor). Ces derniers contrôlent respectivement l'élimination des radicaux libres et la stimulation de la prolifération (Burdelya et al., 2008).

L'ensemble des études discutées dans ces paragraphes ont montré que le facteur NF- $\kappa$ B est un régulateur critique de l'homéostasie immunitaire et de l'inflammation dans le tissu épithélial intestinal.

## **VI.2. NF- $\kappa$ B et l'inflammation intestinale**

### **VI.2.1. NF- $\kappa$ B dans la destruction inflammatoire de l'intestin**

Plusieurs modèles d'inflammation induite chez des souris par des agents chimiques comme le DSS ou le TNBS (acide 2, 4,6-TriNitroBenzene Sulfonique) ont été développés pour étudier l'inflammation intestinale. Ces inflammations sont caractérisées par une forte production de cytokines pro-inflammatoires. De multiples évidences montrent que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B contribue activement au développement et au maintien de l'inflammation intestinale. NF- $\kappa$ B est suractivé dans la muqueuse de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Schreiber et al., 1998), tandis qu'une inhibition pharmacologique de son activation améliore nettement l'inflammation intestinale dans les modèles de colite chez la souris.

L'administration d'oligonucléotides spécifiques de la sous-unité p65 ou d'un peptide qui se lie à la sous-unité NEMO et inhibe l'activation IKK, réduit la sévérité des colites induites par produits chimiques ou dans les souris IL-10<sup>-/-</sup> (Dave et al., 2007; Neurath et al., 1996). Ces études suggèrent qu'une inhibition de l'activation excessive de la voie NF- $\kappa$ B pourrait avoir des effets thérapeutiques chez les sujets atteints de MICI. En effet, cette inhibition pharmacologique ne permet pas de conclure quant à un rôle de la suractivation de NF- $\kappa$ B dans les IECs ou dans les cellules immunitaires mucosales. Dans le modèle de colite IL-10<sup>-/-</sup>, NF- $\kappa$ B est plutôt activé dans les cellules immunitaires mucosales et non dans les IECs. Karrash a montré que la régulation de l'activité NF- $\kappa$ B au début de la colite chez les souris IL-10<sup>-/-</sup> suit une cinétique distincte dans les IECs et dans les cellules immunitaires mucosales (Karrasch et al., 2007). La colonisation des souris axéniques IL-10<sup>-/-</sup>, qui ne développent pas de colite (Sellon et al., 1998), avec les bactéries colitogènes est associée à une activation

rapide et transitoire de NF- $\kappa$ B dans les IECs, tandis que les cellules immunitaires de la *lamina propria* présentent une activation de NF- $\kappa$ B retardée mais persistante (Karrasch et al., 2007).

Il a été montré que l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B par inactivation d'IKK $\beta$  dans les IECs ne change pas l'incidence et la sévérité de la colite. Cependant une ablation de cette protéine dans les cellules myéloïdes diminue l'occurrence de la colite chez les souris IL-10<sup>-/-</sup> (Eckmann et al., 2008). Ces résultats montrent que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules myéloïdes joue un rôle important dans l'induction de l'inflammation colique dans ce modèle.

Une autre étude a permis l'identification des modules de la signalisation et des types cellulaires impliqués dans la perturbation de l'inflammation intestinale. Chez les souris RAG-déficientes<sup>21</sup> infectées par la bactérie *Helicobacter hepaticus* induisant une colite, la présence de la sous-unité c-Rel de NF- $\kappa$ B est nécessaire pour l'induction de l'inflammation. L'impossibilité d'induire la colite chez des animaux déficientes en c-REL s'accompagne d'une diminution de l'expression d'IL-12p40 et d'IL-23p19<sup>22</sup> dans les macrophages induite par les dimères de NF- $\kappa$ B contenant c-Rel (Wang et al., 2008). Par ailleurs, des expériences de transfert de moelle osseuse chez les souris RAG<sup>-/-</sup>, ont montré que la signalisation MyD88 dans les cellules hématopoïétiques était nécessaire pour le développement de l'inflammation intestinale chronique induite par *H. hepaticus*. Ces résultats indiquent que les effets pro-inflammatoires de MyD88 dans ce modèle de colite résident dans les cellules de l'immunité innée (Asquith et al., 2010).

Récemment, une étude a montré que les souris déficientes pour l'adaptateur TRIF sont plus résistantes à la colite induite au DSS que les souris témoins (Choi et al., 2010). Bien que, la suppression de la réponse à l'interféron de type I dépendant de TRIF pourrait être impliquée dans ce phénotype, cette observation suggère que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dépendant de TRIF pourrait avoir des effets nuisibles pendant l'inflammation intestinale.

Il a été montré que les souris dépourvues des régulateurs négatifs de l'activation NF- $\kappa$ B ; CYLD (deubiquitineuse de NEMO) (Courtois, 2008) et SIGIRR (inhibiteur sélectif de l'activation NF- $\kappa$ B induite par les membres de la famille TLR/IL-1R) (Garlanda et al., 2009), sont plus sensibles à la colite induite au DSS et développent une inflammation sévère (Garlanda, 2004; Xiao et al., 2007; Zhang et al., 2006). Ces observations suggèrent d'un côté que cette sensibilité à la colite est due vraisemblablement à une destruction de la barrière épithéliale par le DSS suite à une réaction exacerbée des cellules immunitaires déficientes en CYLD. De l'autre côté cette colite sévère est le résultat d'une hyperactivation de la voie NF-

<sup>21</sup> Les souris déficientes en RAG (ou RAG<sup>-/-</sup>) sont dépourvues des lymphocytes B et T

<sup>22</sup> IL-12p40 est une sous-unité partagée entre l'IL-12 et IL-23 alors qu'IL-23p19 est une sous-unité spécifique d'IL-23

$\kappa$ B induite par les TLR/IL-1R et qui pourrait être suffisante pour développer l'inflammation intestinale. Dans cette étude, la complémentation des souris *Sigirr*<sup>-/-</sup> avec un transgène exprimant SIGIRR spécifiquement dans IECs, sauve les souris de la colite au DSS. Ceci montre ainsi qu'une fonction spécifique de SIGIRR dans l'épithélium protège les souris de la colite induite au DSS (Xiao et al., 2007). En accord avec cette observation, la suppression du régulateur négatif A20 de NF- $\kappa$ B dans les IECs a été récemment montré pour sensibiliser les souris à l'inflammation intestinale induite au DSS (Vereecke et al., 2010).

En final, l'ensemble des études réalisées sur plusieurs modèles de colite chez la souris ont montré qu'une activation exacerbée de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules immunitaires de la muqueuse ou dans les IECs, peut être à l'origine d'une inflammation intestinale sévère.

### **VI.2.2. NF- $\kappa$ B chez les patients atteints des pathologies inflammatoires intestinales**

Les observations faites en utilisant de nombreux modèles d'inflammation chez l'animal sont pour la plus grande partie corrélées avec celles effectuées chez les patients atteints de MICI. Les biopsies de zones inflammatoires du tube digestif prélevées sur les patients atteints de MICI ont montré une activation excessive de la voie NF- $\kappa$ B. Le taux d'activation de cette dernière était fortement corrélé avec la sévérité de l'inflammation (Rogler et al., 1998). De plus, les macrophages et les cellules épithéliales isolés de biopsies inflammées présentent une forte augmentation de l'expression p65 actif (Ellis et al., 1998; Neurath et al., 1998). Des études cliniques ont montré que certains patients portant une mutation de sous-unité régulatrice NEMO souffrait des colites (Pasparakis, 2009).

Les lésions intestinales dans les MICI sont associées à une augmentation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et probablement à un déficit relatif en cytokines anti-inflammatoires. Comme dans les modèles animaux, les profils de synthèse de cytokines immunorégulatrices varient au cours de l'évolution des MICI. Une augmentation de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B est accompagnée de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et IL-6 par les macrophages et l'IL-12 et l'IL-23 par les CD. Les cytokines TNF- $\alpha$ , et IL-1 peuvent avoir un effet direct sur la destruction de la barrière épithéliale et sont impliquées dans les lésions inflammatoires intestinales chroniques. Elles induisent la production des métalloprotéinases qui ont pour effet d'endommager la matrice extracellulaire (Pallone and Monteleone, 2001). La majorité des cytokines produites lors de l'inflammation sont responsables de la stimulation, l'activation, et ainsi de la différenciation des cellules immunitaires présentes dans la *lamina propria*. Par exemple l'IL-

12 et l'IL-23 sont responsables de la différenciation des lymphocytes Th1, un type cellulaire important dans la pathogenèse des MICI (Atreya et al., 2008).

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les fibroblastes de la *lamina propria* du côlon par le ligand du CD40 sécrété par les lymphocytes T, déclenche la production par ces fibroblastes d'IL-8, d'IL-6 et de MCP (Monocyte Chemotactic Protein). Ainsi, la production de cytokines pro-inflammatoires par les fibroblastes pourrait impliquer ces derniers dans l'immunopathogénèse des MICI (Gelbmann et al., 2003). Il a été également montré que l'IL-6 produite était capable d'activer la voie NF- $\kappa$ B dans un modèle de cellules épithéliales coliques. Elle régulait aussi positivement l'expression d'une molécule d'adhésion ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) impliquée dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles sur le site de l'inflammation (Wang et al., 2003).

## **Chapitre IV : Dialogue microbiote-hôte : décryptage d'un langage complexe**

L'homme est colonisé par un microbiote complexe en contact permanent avec la muqueuse digestive. Le décryptage et la connaissance des bases moléculaires du dialogue qui s'instaure entre les bactéries commensales et l'hôte viennent juste de commencer. En revanche, l'étude des infections bactériennes a permis de caractériser les mécanismes développés par les bactéries pathogènes pour franchir les barrières épithéliales ou endothéliales et pour échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Comprendre la réponse de l'hôte mise en place vis-à-vis des bactéries pathogènes est un tremplin vers le décryptage de la réponse de tolérance de l'hôte envers les bactéries commensales. La muqueuse intestinale est le siège principal de l'initiation des réponses immunorégulatrices permettant à la fois de tolérer les commensaux et de défendre l'hôte contre les invasions de pathogènes présents dans la lumière intestinale.

### **I. Tolérance immunitaire des bactéries commensales**

Les bactéries commensales vivent en symbiose dans la lumière intestinale et colonisent la surface de l'épithélium sans déclencher de réponse immunitaire et inflammatoire. L'épithélium intestinal de son côté doit mettre en place un ensemble de stratégies permettant de préserver ses fonctions essentielles et maintenir l'homéostasie intestinale. Cette dernière dépend d'une interaction complexe entre le microbiote, l'épithélium intestinal et le système immunitaire de l'hôte. Divers mécanismes régulateurs coopèrent ensemble pour maintenir l'homéostasie intestinale. Une dérégulation de l'un de ses acteurs conduit au développement de l'inflammation et précipite l'apparition des pathologies inflammatoires chroniques comme les MICI.

Les différents mécanismes de « tolérance » du microbiote commensal mettent donc en jeu une participation active de ce dernier, de l'épithélium intestinal et du système immunitaire muqueux. Le dialogue permanent entre ces trois piliers par une action coordonnée, assure le maintien de l'homéostasie intestinale en protégeant l'hôte d'agressions délétères.

#### **I.1. Mécanismes de tolérance mis en place par la cellule épithéliale**

Au niveau cellulaire, le dialogue dynamique entre les cellules épithéliales intestinales (IECs), le microbiote et les cellules immunitaires locales, représente l'une des caractéristiques fondamentales pour le maintien de l'homéostasie intestinale (Artis, 2008; Hooper and Macpherson, 2010). Les cellules épithéliales forment une barrière physique contre le

microbiote résidant dans l'intestin et sécrètent un panel de molécules à activité anti-microbiennes pour contrôler la charge bactérienne à proximité. En plus de cette fonction barrière, les cellules de l'épithélium disposent de plusieurs mécanismes lui permettant d'ignorer la présence des bactéries commensales et limiter ainsi leur pénétration à l'intérieur des tissus.

## **I.2. Expression des PRR**

Les cellules épithéliales intestinales possèdent une capacité efficace à distinguer et discriminer les différents éléments du microbiote commensal et les micro-organismes pathogènes grâce à l'expression de récepteurs spécifiques appelés PRRs. Plusieurs évidences indiquent que la détection du microbiote par ces récepteurs PRRs conduit à compléter de nombreuses fonctions dans les IECs et les cellules hématopoïétiques contrôlant homéostasie intestinale (Abreu, 2010; Asquith et al., 2010; Cario, 2010). En effet le contexte d'activation des PRRs est crucial. Dans l'intestin sain, l'activation basale des PRRs maintient la fonction de barrière contre les bactéries commensales, mais la signalisation aberrante *via* ces derniers peut être un initiateur central des pathologies intestinales (MICI). Il a été montré que les IECs des patients atteints des MICI présentent une forte expression des TLRs spécifiquement le TLR4 et une expression similaire ou faibles des TLR2, TLR3, TLR5 et TLR9 par rapport aux IECs provenant des individus contrôles (Cario and Podolsky, 2000; Pedersen et al., 2005; Vamadevan et al., 2009). De plus, les cytokines inflammatoires régulent aussi l'expression des TLRs par IECs (Abreu et al., 2002; Mueller et al., 2006; Rehli et al., 2000). Plusieurs études ont montré que l'IFN $\gamma$  et le TNF induisent l'expression du TLR4 et son co-récepteur MD2 (Abreu et al., 2002; Suzuki et al., 2003).

### **I.2.1. Compartimentation des PRRs**

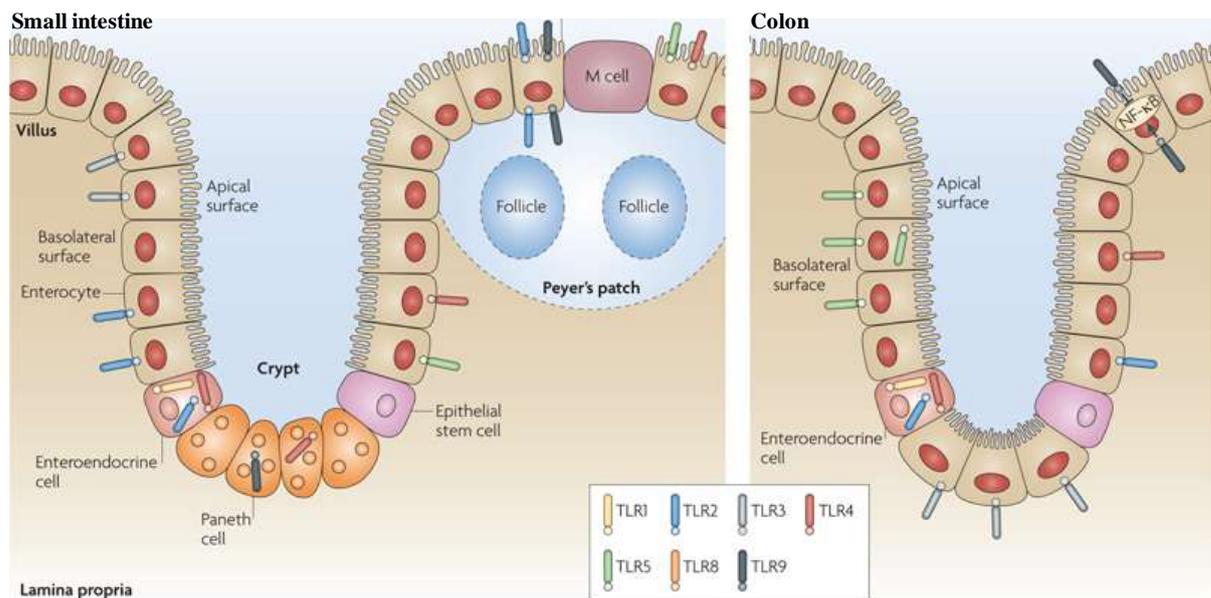
La localisation des TLRs et les NLRs dans la cellule épithéliale ainsi que leurs signalisations différentielles au niveau du pôle apical ou basal jouent un rôle clef dans la régulation des réponses immunitaires induites par les bactéries commensales de l'intestin. Certains de ces récepteurs sont localisés dans le compartiment cytoplasmique des cellules. Cette compartimentation permet à ces récepteurs de n'entrer en contact qu'avec les bactéries pathogènes invasives pénétrant dans la cellule, et ignorer l'existence de toutes bactéries dans la lumière du tube digestif.

L'exemple le plus typique est celui du TLR4, reconnaissant spécifiquement le LPS. La signalisation par ce récepteur se produit généralement à la surface de la membrane cytoplasmique suite à l'attachement du LPS au complexe TLR4 et son adaptateur MD2 (Park

et al., 2009; Saitoh and Miyake, 2009). Le TLR4 a été trouvé dans l'appareil de Golgi co-localisé avec le LPS internalisé dans une lignée de cellules épithéliales de l'intestin grêle de souris (Hornef et al., 2002). Cette étude a montré que l'activation de ce récepteur nécessite l'internalisation du LPS (Hornef et al., 2003). Cette observation suggère de prévenir l'activation non spécifique de TLRs apical par les bactéries commensales et que la localisation intracellulaire du TLR4 peut différer entre les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunitaires. Il a été également montré que la localisation de TLR peut aussi changer suite à une stimulation avec un ligand (Cario et al., 2002).

### 1.2.2. Polarisation des PRRs

Pour éviter le contact des ligands de bactéries commensales avec les TLRs de surface, l'expression de ces derniers dans l'intestin suit une régulation spatiale polarisée (apicale ou basolatérale) au niveau des cellules épithéliales (**Figure 26**). Le TLR2 et le TLR4 sont exprimés sur la surface basolatérale des entérocytes de la crypte iléale dans le fœtus humain (Fusunyan et al., 2001). Bien que l'expression de ces récepteurs soit faible dans le côlon d'un adulte sain (Cario and Podolsky, 2000), le TLR4 est fortement exprimé sur le pôle apical des colonocytes des patients avec la maladie de Crohn active (Cario and Podolsky, 2000). Il a été montré que les entérocytes peuvent induire une réponse inflammatoire aux LPS bactérien *via* le TLR4. La faible expression de ce récepteur à la surface des lignées épithéliales intestinales *in vitro* (Furrie et al., 2005) pourrait éviter une réponse excessive aux LPS des bactéries commensales. Le TLR4 semble néanmoins contrôler certaines fonctions des entérocytes. L'étude de Fukata a montré que les souris TLR4 *-/-* ou MyD88 *-/-* (molécule adaptatrice) sont plus sensibles à la colite induite au DSS par rapport au souris sauvages (Fukata et al., 2005). De plus, la stimulation prolongée du TLR4, due en partie à sa surexpression par les entérocytes, favorise le développement d'une entéocolite ulcéro-nécrosante chez les souris alors que son absence est protectrice (Jilling et al., 2006). L'expression de ce récepteur TLR4 et son adaptateur par les entérocytes est nécessaire à l'expression de COX-2. Cette enzyme protectrice, qui stimule la prolifération cellulaire et ralentit l'apoptose induite au cours de la colite au DSS, favorise la réparation tissulaire de l'intestin (Fukata et al., 2006). Elle pourrait cependant après une activation chronique, d'augmenter le risque de cancers coliques comme dans le cas des rectocolites hémorragiques. Une stimulation prolongée du TLR4 surexprimé par les entérocytes, favorise le développement d'une entéocolite-nécrosante chez les souris, alors que l'absence de ce récepteur est protectrice (Jilling et al., 2006).



**Figure 26 : Polarisation des PRRs au niveau des cellules épithéliales intestinales (Abreu M; Nature Reviews/Immunology, 2010)**

L'expression des TLRs au niveau des cellules épithéliales intestinales suit une régulation polarisée. La majorité de ces TLRs sont exprimés à la surface basolatérale des cellules afin d'éviter le contact avec les ligands de bactéries commensales. Au niveau du petit intestin, l'expression du TLR3, TLR4 et TLR5 est observée à la surface basolatérale des entérocytes. Au niveau du côlon, le TLR3 et le TLR5 sont fortement exprimés alors que le TLR2 et TLR4 sont moins exprimés. Le TLR 9 exprimé sur les deux pôles des entérocytes, présente un effet opposé sur l'activation du facteur NF- $\kappa$ B suivant une stimulation apicale ou basolatérale.

L'analyse *in vitro* des IECs humaines polarisées a montré que le TLR5 exprimé uniquement sur la surface basolatérale peut, en réponse à la flagelline, déclencher la production de cytokines et chemokines, comme l'IL-8 et CCL20 (CC-chemokine ligand 20) (Gewirtz et al., 2001; Lee et al., 2006). Ainsi, la flagelline de la lumière intestinale pourrait activer ce récepteur seulement après un dommage de la barrière épithéliales comme celui induit par le DSS (Rhee et al., 2005).

Un autre exemple de l'expression polarisée des TLR est celui du TLR9, reconnaissant les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien. Ce récepteur, *in vivo* et *in vitro* est exprimé à la surface des deux pôles des entérocytes. Il a été montré qu'une stimulation du TLR9 au pôle apical des entérocytes inhibait l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et la production des cytokines pro-inflammatoires alors qu'une stimulation basolatérale induisait une forte réponse inflammatoire (Lee et al., 2006). Ces résultats suggèrent que l'activation apicale du TLR9 par les produits bactériens de la lumière intestinale, a un effet protecteur pour l'hôte et participe au maintien de l'homéostasie et la tolérance intestinale. Ces observations montrent que la localisation du TLR peut être polarisée dans la cellule épithéliale intestinale et que sa fonction peut changer en fonction de sa localisation.

### **I.2.3. Absence de réponse des PPRs à la surface**

Nous avons montré que les profils d'expression de certains TLR et leurs réponses sont différents au niveau des cellules épithéliales. En effet, ils peuvent être absents ou non fonctionnels, ce qui est le cas des TLR2 et TLR4. Ces deux récepteurs sont très peu exprimés à la surface des cellules épithéliales intestinales (Furrie et al., 2005). Leur expression semble associée à la localisation des cellules dans les cryptes et elle diminue jusqu'à disparaître au fur et à mesure que les cellules rejoignent la surface (Sansonetti, 2004).

Nous avons vu que la stimulation chronique du TLR4 joue un rôle délétère au niveau de l'épithélium intestinal et explique que ce récepteur doit rester « silencieux » malgré une exposition permanente aux LPS des bactéries commensales intestinales (Abreu et al., 2005). Cette tolérance au LPS à travers le TLR4 est établie très tôt. En effet, une étude chez la souris a montré que les cellules épithéliales intestinales sont tolérantes au LPS juste au moment de la naissance, permettant ainsi une colonisation microbienne facilitée et le développement d'une relation hôte-microbiote stable dans le temps (Lotz, 2006).

L'expression de certains TLR comme le TLR2, TLR4 et leurs adaptateurs est également fortement atténuée dans les TECs provenant d'un côlon humain sain (Cario and Podolsky, 2000; Otte et al., 2004). Il a été montré chez un nombre de ces cellules que, malgré la présence des ARNm, ces TLR sont quasiment absents à leur membrane (Bocker et al., 2003; Cario and Podolsky, 2000; Melmed et al., 2003; Schuerer-Maly et al., 1994). Une autre étude a montré que les colonocytes humains isolés des IECs présentent de l'ARNm du TLR9, mais peu de la protéine de ce récepteur, et il n'y a aucune sécrétion d'IL-8 en réponse au ligand de ce dernier (Pedersen et al., 2005). Cette observation suggère qu'il est possible que les IECs humains répondent à l'activation du TLR9, mais sans déclencher la sécrétion d'IL-8. L'ensemble de ces travaux expliquent l'absence de réponse des cellules épithéliales intestinales envers leurs ligands présents dans la lumière du tractus digestif.

### **I.3. Signalisation *via* les TLR**

La signalisation intracellulaire par les TLRs joue un rôle important dans la protection vis-à-vis des pathologies inflammatoires intestinales. Elle limite le contact des bactéries commensales avec la couche des IEC, ainsi que leur pénétration, une fois cette dernière est endommagée. Les souris déficientes en TLRs, comme le TLR2, TLR4, TLR5 et le TLR9 ou invalidées pour l'adaptateur MyD88 présentent une forte sensibilité à la colite induite au DSS (Abreu, 2010; Cario, 2010; Fukata et al., 2005). La signalisation par les TLRs conduit à des effets protecteurs intrinsèques dans les IECs. Elle induit l'expression de plusieurs facteurs

prolifératifs et anti-apoptotiques, favorise la reconstitution épithéliale et fortifie les jonctions serrées intercellulaires (Abreu, 2010; Cario, 2010).

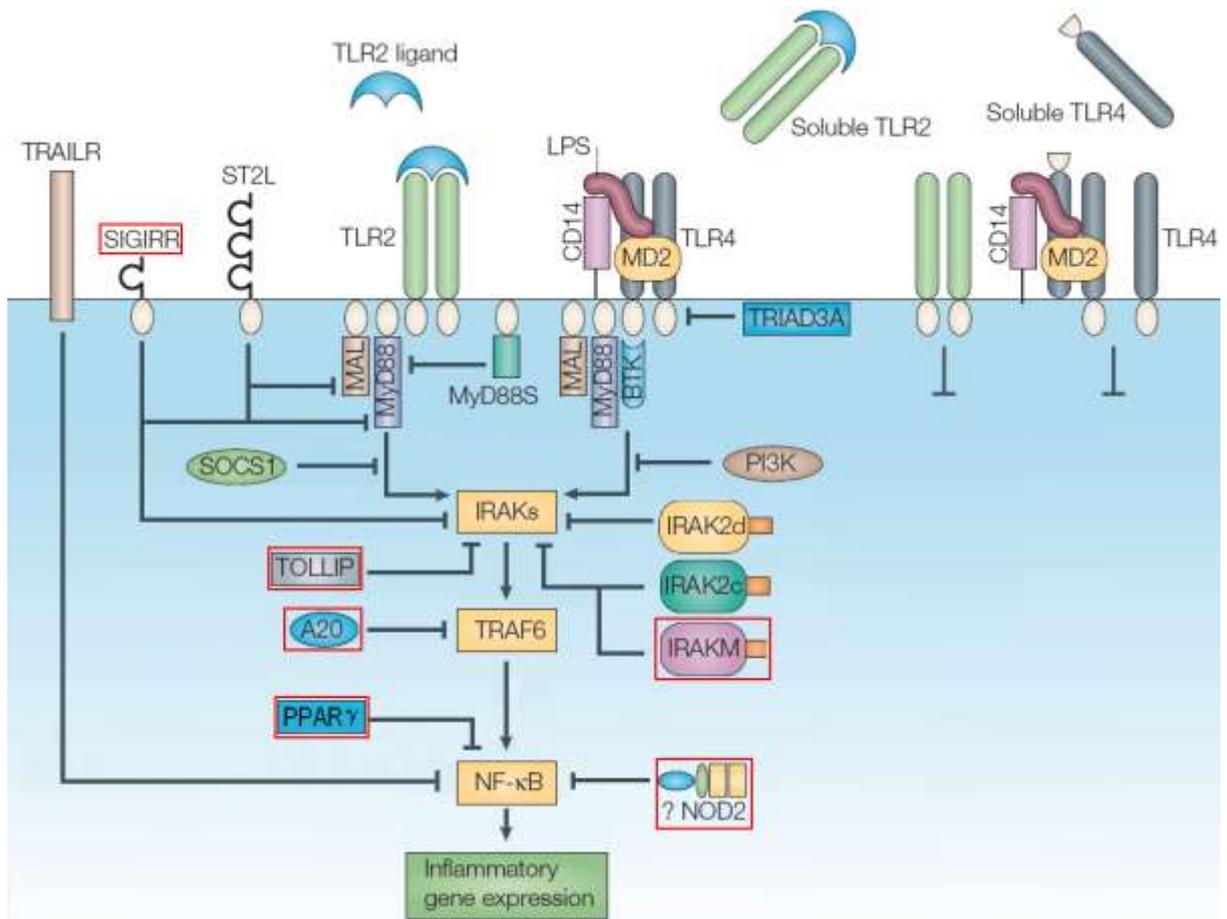
La signalisation intracellulaire des TLRs dans les IECs limite également la colonisation et la translocation bactérienne dans ces cellules en stimulant la production des AMPs (AntiMicrobial Peptides), comme les défensines et les RegIII $\gamma$  (Asquith et al., 2010; Koslowski et al., 2009). Une étude a montré que l'expression sélective de MyD88 limitée aux cellules de Paneth permet à ces dernières de détecter les bactéries commensales directement par les TLRs. Cette détection induit la production des AMPs limitant la translocation bactérienne dans la muqueuse intestinale (Vaishnava et al., 2008).

L'activation des NLRs cytosoliques, comme les NODs, est aussi importante dans le maintien de la fonction barrière contre les bactéries commensales. Les souris déficientes pour Nod1 ou pour Nod2, comme les patients Crohn portant une mutation sur l'allèle NOD2, ont montré des anomalies dans la sécrétion de défensines et une augmentation de la susceptibilité à la colite induite au DSS (Chen et al., 2008; Strober et al., 2006). Une étude récente a indiqué que le NLR impliqué dans l'activation de l'inflammasome contribue également à la protection de l'épithélium après un dommage. Les souris déficientes pour le NLRP3 ou son adaptateur ASC ou caspase-1 ont montré une amélioration de la colite chez les souris après administration du DSS (Allen et al., 2010; Dupaul-Chicoine et al., 2010).

Les différentes études discutées dans ce paragraphe soulignent le rôle bénéfique de la signalisation par les TLR dans le contrôle de l'homéostasie intestinale.

#### **I.4. Régulations négatives de la signalisation *via* les TLR**

Plusieurs études sur des souris invalidées ou des modèles cellulaires ont permis d'identifier de nombreux régulateurs négatifs de la cascade de signalisation des TLRs nuisible dans les IECs (**Figure 27**). A ce jour, six inhibiteurs sont connus pour être présents et agir au niveau de l'épithélium intestinal (encadrés en rouge, figure 10) (Cario and Podolsky, 2005; Liew et al., 2005; Shibolet and Podolsky, 2007).



**Figure 27 : Mécanismes d'inhibition de la signalisation TLR (modifiée d'après Liew *et al.*, 2005).**

Tollip (Toll-interacting protein) est une protéine intracellulaire qui inhibe la signalisation par le TLR2 et le TLR4 en bloquant l'activité kinase d'IRAK4 (Burns *et al.*, 2000; Zhang and Ghosh, 2002). Elle est exprimée *in vitro* par les IECs (Melmed *et al.*, 2003), notamment par les HT-29 et les Caco-2, ce qui expliquerait en partie la faible réactivité de ces lignées à une activation de leurs TLR2 et TLR4 (Melmed *et al.*, 2003; Otte *et al.*, 2004). L'inhibition par Tollip de l'activation TLR suite à une stimulation spécifique par le LPS ou l'acide lipoteichoïque constitue l'un des phénomènes de tolérance au LPS bactériens (Otte *et al.*, 2004). Les IECs des patients atteints des MICI présentent une dérégulation de l'expression de Tollip, suggérant ainsi la contribution de cette protéine dans l'inflammation chronique (Steenholdt *et al.*, 2009).

SIGIRR (Single immunoglobulin IL-1R-related molecule), aussi connue comme TIR8, est un régulateur négatif de la signalisation par l'IL-1R, IL-33R, le TLR4 et le TLR9 (Wald, 2003). Cette protéine transmembranaire est hautement exprimée au niveau des IECs, et sa délétion augmente la susceptibilité et la sévérité de l'inflammation intestinale chez les animaux (Garlanda, 2004; Xiao *et al.*, 2007). SIGIRR joue un rôle important dans la

régulation de l'inflammation intestinale, mais aucun ligand n'a encore été identifié et son implication éventuelle dans les pathologies inflammatoire humaines reste à explorer (Garlanda et al., 2009).

PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ ) est un membre de la grande famille des récepteurs nucléaires. Cette protéine est l'un des inhibiteurs négatifs de l'activation NF- $\kappa$ B exerçant un rôle direct sur le facteur de transcription dans le noyau (Dubuquoy et al., 2003; Kelly et al., 2004; Ogawa et al., 2005). L'expression de PPAR $\gamma$  dans l'épithélium intestinal est induite par la signalisation *via* le TLR4, et donc il peut inhiber l'inflammation médiée par les TLR (Dubuquoy et al., 2003). Il est intéressant de noter que cet inhibiteur est constitutivement exprimé par les colonocytes *in vivo* (Lefebvre et al., 1999).

A20 est une enzyme dont l'expression est induite par NF- $\kappa$ B lui même dans la boucle de régulation négative. Cette enzyme a deux fonctions opposées (déubiquitinase, ubiquitine-ligase) mais complémentaires pour obtenir la terminaison de la signalisation NF- $\kappa$ B (Sun, 2008) (**Figure 27**). Dans la signalisation TLR, A20 interagit avec TRAF6, RIP1 et NEMO (Hymowitz and Wertz, 2010). Les souris déficientes pour cette protéine développent des inflammations sévères après la naissance qui est suivit d'une mortalité quelques semaines après (Lee et al., 2000).

Comme A20, il existe plusieurs régulateurs négatifs de la boucle d'activation de NF- $\kappa$ B en particulier Cézanne (Enesa et al., 2008), CYLD (Sun, 2010), IRAK-M (van 't Veer et al., 2007; Wesche et al., 1999) et SARM (Carty et al., 2006), le mode d'action de ces inhibiteurs est développé dans le chapitre précédant.

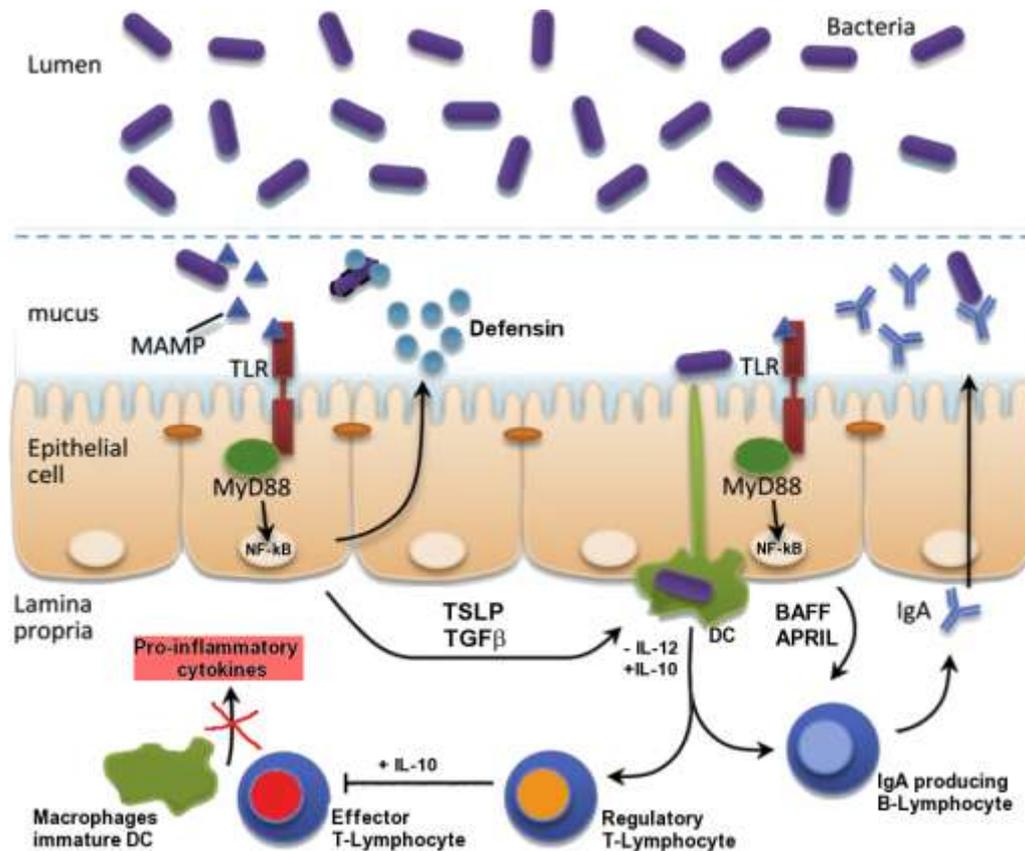
Enfin, un effet inhibiteur de NOD2 au niveau de la signalisation du TLR2 a été décrit mais le mécanisme d'action reste inconnu (Watanabe et al., 2004; Watanabe et al., 2006). Il a été également montré que les niveaux d'expression par les IECs de MD-2 reconnaissant le LPS (Park et al., 2009; Shimazu et al., 1999) sont très basses (Abreu et al., 2001; Lenoir et al., 2008), peut être suite à une dégradation par la trypsine produite par le pancréas (Cario et al., 2006), permet de limiter l'hypersensibilité au LPS et favoriser la tolérance de ce dernier par l'épithélium intestinal.

L'invalidation de ces mécanismes régulateurs *in vivo* ou *in vitro*, se traduit par une augmentation de la production des marqueurs inflammatoires par les IECs. En plus de leur capacité à contrôler négativement la signalisation TLR pour tolérer les bactéries commensales intestinales, il est important de connaître les éléments déclenchant l'extinction de ces mécanismes inhibiteurs lors du contact avec un agent pathogène (Shibolet and Podolsky, 2007).

### **I.5. Sécrétion de cytokines par IECs**

Les cellules épithéliales influence l'homéostasie intestinale par la production des cytokines affectant la réponse immunitaire adaptative déclenchée par les CD intestinales (Artis, 2008). Dans l'intestin sain, ces facteurs de conditionnement des CD ayant pour fonction d'échantillonner le contenu luminal, aident à maintenir un état de réponse faible vers les bactéries commensales. Les cytokines constitutivement exprimées par les IECs comme TSLP et IL-25 peuvent induire une tolérance. Ils induisent la production par les CD de grandes quantité d'IL-10, et de peu de p40 (sous-unité d'IL-12), et d'IL-23, limitant ainsi les réponses Th1 et favorisent une réponse immune régulatrice (Artis, 2008; Rimoldi et al., 2005; Taylor et al., 2009).

Les cellules épithéliales intestinales influencent aussi les réponses de sécrétion d'anticorps locales en produisant des facteurs comme le TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (a proliferation-inducing ligand) qui stimulent directement les cellules B pour s'orienter vers la production d'IgA (Fagarasan et al., 2010). Les IECs assurent également le transport des IgA sécrétoires dans la couche de mucus, où ils ont un rôle complémentaire aux défenses innées en limitant la pénétration de bactéries commensales à travers l'épithélium intestinal (**Figure 28**) (Fagarasan et al., 2010; Slack et al., 2009).



**Figure 28 : Cellules épithéliales et contrôle de la réponse immunitaire adaptative. (modifiée d'après Duerkop *et al.*, 2009)**

La production de cytokines immunorégulatrices par les cellules épithéliales est dépendante de la présence des bactéries commensales à leur surface, qui permettent l'induction d'une réponse inflammatoire protectrice et tolérante (Artis, 2008).

### **I.6. Rôle du microbiote**

Les bactéries commensales participent activement au maintien de l'homéostasie épithéliale en modulant la réponse cellulaire de l'hôte au niveau des mécanismes de tolérance. Les mécanismes régulés par les bactéries commensales sont pour la plupart liés à la modulation de la signalisation intracellulaire immunitaire en particulier la réponse NF-κB des cellules épithéliales intestinales.

### **I.7. Expression et stimulation des TLRP**

Les études comparatives de souris axéniques *versus* conventionnelles ont démontré que les bactéries commensales induisent l'expression de certains TLRs (TLR2 à TLR5) des cellules épithéliales (Lundin *et al.*, 2008). En effet, l'expression du TLR9 au niveau du pôle apical des cellules coliques est observée uniquement chez les souris conventionnelles (Ewaschuk *et al.*, 2007). De plus, la présence permanente de composés bactériens spécifiques

empêche les réponses immunes. Ils induisent un état silencieux des cellules épithéliales en diminuant l'expression des TLR2 et TLR4 (Otte et al., 2004). Les LPS et LTA (Acide lipotéichoïque) présents sur les bactéries commensales, sont des signaux d'induction des TLR2 et TLR4, influencent aussi l'homéostasie intestinale (Medzhitov, 2007). En effet, les souris déplétées de leur microbiote après traitement antibiotique ou déficientes pour la signalisation TLR présentent une inflammation intestinale et une augmentation de la mortalité en réponse à une colite induite au DSS. Le traitement de ces souris avec du LPS ou des LAT limite l'inflammation intestinale et protège les animaux du développement de la colite chimique (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Cette étude montre que l'activation des TLRs par les bactéries commensales joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale. Mais, une forte expression de ces deux TLRs est retrouvée dans la muqueuse iléale de patients atteints de MICI (Frolova et al., 2008).

La stimulation apicale du TLR9 par les produits bactériens du microbiote inhibe la voie NF- $\kappa$ B induite par l'activation d'autres TLRs (Lee et al., 2006). En conséquence, elle protège l'hôte et participe au maintien de l'homéostasie intestinale. De plus, Cario et ses collaborateurs ont montré que l'induction du TLR2 régulait positivement l'expression des molécules des jonctions serrées (ZO-1) par une voie de signalisation différente de NF- $\kappa$ B (Pi3kinase/Akt). Dans un modèle de colite DSS, cela se traduit par une amélioration de l'inflammation de la muqueuse et de l'apoptose lorsqu'un ligand du TLR2 (Pam<sub>3</sub>Cys-SK4) est administré oralement aux souris. Cette amélioration serait attribuée à une restauration efficace des jonctions serrées (Cario et al., 2007). La stimulation du TLR2 est capable d'induire l'expression, sous dépendance de l'activation NF- $\kappa$ B, de défensines qui jouent un rôle dans la restauration de la barrière épithéliale après un dommage inflammatoire (Uehara et al., 2007).

De même, plusieurs bactéries probiotiques favorisent la productions de défensines, de mucus et de glycoprotéines synthétisées par les cellules épithéliales intestinales (Reiff and Kelly, 2009). Pourtant les mécanismes d'action ne sont pas décrits mais compte tenu du rôle du TLR2 dans la production de défensines notamment, on ne peut pas exclure que l'effet de ces probiotiques puisse être dépendant d'une stimulation des TLRs. Il a été montré que certains lactobacilles, le mélange de VSL#3 et *E. coli Nissle* 1917 induisent, par un mécanisme dépendant des signalisations AP-1 et NF- $\kappa$ B, la production de  $\beta$ -défensines 2 par des cellules épithéliales intestinales (Schlee et al., 2008; Schlee et al., 2007).

## I.8. Modulation de la signalisation pro-inflammatoire NF-κB

Les bactéries commensales exercent un rétro-contrôle de l'activation des voies pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales intestinales (Artis, 2008; Sansonetti, 2008). Les premières observations ont montré que ces bactéries commensales limitent l'induction du facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB. De nombreux points de cette cascade de signalisation ont été la cible de régulation négative par les bactéries ou leurs composants.

### I.8.1. Modulation ciblant l'inhibiteur IκB

L'un des mécanismes d'inhibition de l'activation NF-κB par les bactéries commensales cible la dégradation d'IκBα un inhibiteur du facteur NF-κB. Ainsi, la bactérie commensale *Salmonella enteritidis* (non pathogène), et les probiotiques *Lactobacillus casei* ou le surnageant de VSL#3, inhibent l'expression de gènes inflammatoires par la diminution de l'activité ubiquitine/protéasome impliquée dans la dégradation d'IκB-α (Neish et al., 2000; Petrof et al., 2004b; Tien et al., 2006). Une étude a démontré que les bactéries commensales pouvaient altérer la machinerie cellulaire qui contrôle le processus d'ubiquitination et de dégradation d'IκB-α dans les cellules épithéliales. En effet, le contact de *Bacteroides thetaiotaomicron* ou *Lactobacillus rhamnosus GG* avec les cellules épithéliales génère des espèces réactives de l'oxygène capables d'inhiber la neddylation de la cullin-1, une des sous-unités régulatrices de l'ubiquitine-ligase SCF<sup>β<sup>trp</sup></sup>. Ceci conduit à un défaut d'ubiquitination d'IκB-α et à une inhibition de sa dégradation, ce qui par conséquent diminue l'activation de NF-κB (Kumar et al., 2007).

Des études récentes ont aussi montré que les bactéries probiotiques ou leurs produits de sécrétion sont capables d'inhiber la phosphorylation de la protéine IκB-α, ainsi de réprimer l'expression des gènes pro-inflammatoires dépendante de NF-κB dans les cellules épithéliales HT-29 (Heuvelin et al., 2009; Santos Rocha et al., 2011).

### I.8.2. Modulation dépendante de PPARγ

De nombreux travaux attribuent aux bactéries commensales des effets anti-inflammatoires en empêchant l'activation NF-κB *via* des mécanismes dépendants de PPARγ. La bactérie commensale, *Bacteroides thetaiotaomicron* inhibe chez la souris l'inflammation intestinale induite par une salmonelle pathogène en favorisant l'export nucléaire de la sous-unité RelA du facteur de transcription NF-κB (Kelly et al., 2004). La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par le probiotique *Lactobacillus crispatus* M247 augmente l'expression et l'activation de PPARγ au niveau de lignées épithéliales intestinales. Cette activation provoque une inhibition de NF-κB

en situation inflammatoire, et présente un effet protecteur dans un modèle de colite induite au DSS (Voltan et al., 2008).

### **I.8.3. Modulation dépendante des métabolites bactériens**

Certains produits issus du métabolisme des bactéries commensales régulent la réponse inflammatoire intestinale. Un tripeptide fMLP (n-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) issu des protéines présentes à la surface des membranes de nombreuses bactéries commensales comme *E. coli*, régule négativement la voie NF- $\kappa$ B et module la fonction épithéliale. Le traitement des biopsies intestinales humaines ou des cellules Caco-2 avec le fMLP induit l'expression d'Hsp27 (heat shock protein 27), une protéine capable d'inhiber l'expression du TNF- $\alpha$  et la sécrétion d'IL-8 dépendant de NF- $\kappa$ B, et elle contribue à renforcer la barrière épithéliale (Carlson et al., 2007). Le butyrate produit par les bactéries commensales et utilisé comme source d'énergie pour les colonocytes inhibe l'activation NF- $\kappa$ B. Il réduit l'expression du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 par les lymphocytes de la *lamina propria* et les biopsies intestinales prélevées chez des patients atteints de la maladie de Crohn (Segain et al., 2000). Une étude récente a clarifié l'un des mécanismes de protection par le butyrate. Ce métabolite régule la machinerie redox et contrôle la balance des composés ROS dans la cellule épithéliale. Il diminue ainsi la réponse inflammatoire dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules Caco-2 et au niveau des muqueuses de biopsies intestinales humaines (Russo et al., 2012).

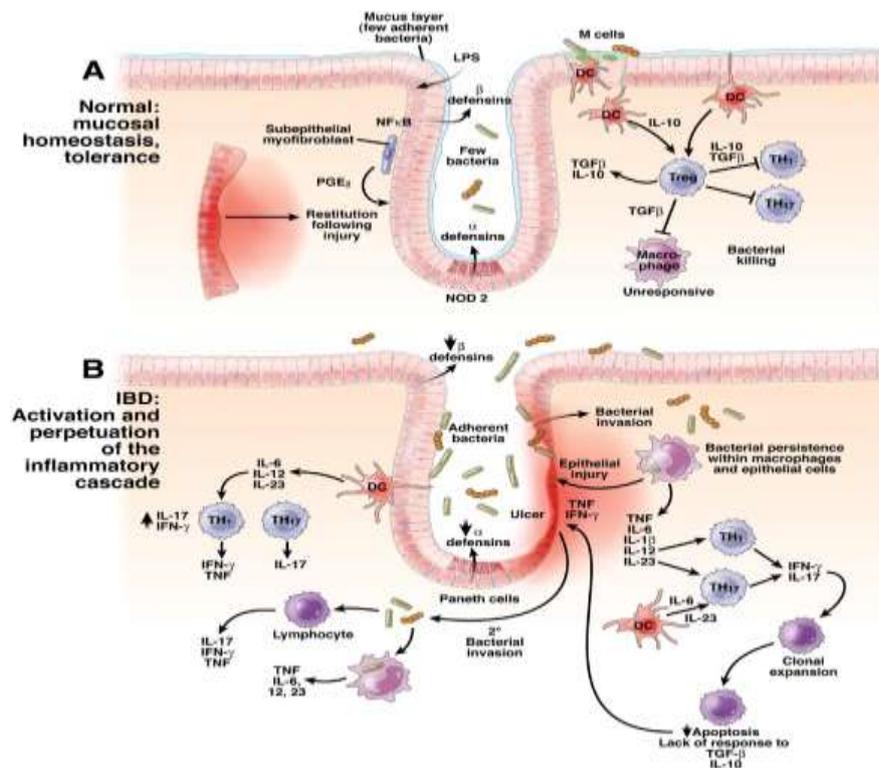
De nombreuses études ont également rapporté les capacités de certaines bactéries probiotiques et commensales à interférer avec l'induction d'une réponse inflammatoire. Cependant, les mécanismes exacts d'action ainsi les effecteurs responsables de l'effet ne sont pas clairement élucidés (Mazmanian et al., 2005; Mazmanian et al., 2008; Menard et al., 2004; Uehara et al., 2007).

## **II. Rupture de tolérance microbiote-hôte et pathologies intestinales**

### **II.1. Pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin**

Le système immunitaire intestinal a pour rôle d'induire une réponse immune envers des microorganismes pathogènes tout en restant relativement peu sensible à ceux du microbiote et aux antigènes alimentaires. La perte de la tolérance de l'hôte vis-à-vis de son microbiote est à l'origine de l'apparition des maladies inflammatoires de l'intestin (MICI). Ces pathologies représentées principalement par la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RH) sont des maladies multifactorielles caractérisées par des poussées inflammatoires

entrecoupées de phases de rémission. Les patients atteints de la MC présentent des lésions segmentaires transmurales touchant la totalité du tractus digestif, et des réponses cytokiniques muqueuses Th1 ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IL-12) et Th17 (IL-17, IL-21, IL-23) exacerbées. Tandis que, la RH se définit par des lésions superficielles de la muqueuse du côlon et par une réponse Th2 atypique, avec une production d'IL-5 et d'IL-13 (Shih and Targan, 2008; Strober et al., 2007). Bien que l'étiologie et la pathogenèse exactes de ces maladies restent encore inconnues à nos jours, il est admis que ces pathologies résultent d'une rupture de la tolérance du système immunitaire envers le microbiote intestinal chez des individus génétiquement prédisposés. Cette perte de tolérance entraîne une réponse immunitaire anormale au niveau de l'épithélium intestinal et transforme l'inflammation physiologique de la muqueuse en réponse inadaptée conduisant à des lésions intestinales (**Figure 29**) (Sartor, 2008).

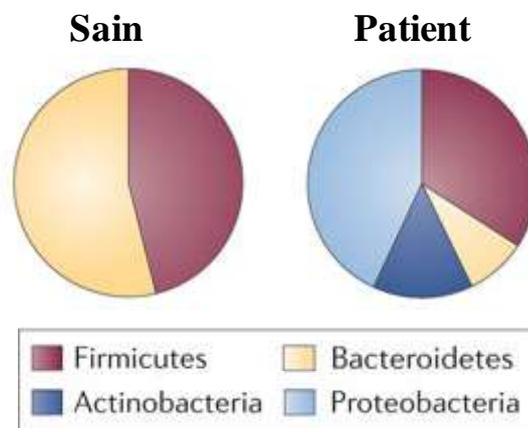


**Figure 29 : Comparaisons des interactions épithélium intestinal/microbiote en situation normale (homéostasie) et inflammatoire (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin: MICI) (Sartor RB, Gastroenterology 2008)**

- En situation normale la capture des antigènes microbiens et la densité microbienne sont limitées et contrôlées. L'épithélium intestinal est dans un état de « non réponse ou silencieux » grâce à l'induction des cellules de l'immunité innée et adaptatives (cellules dendritiques tolérantes, Treg) et la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGFβ) et de peptides anti-microbiens (α-défensines)
- En cas de MICI, l'absence la sécrétion en continue de peptides anti-microbiens favorise l'attachement et l'invasion des bactéries au sein de l'épithélium intestinal. La persistance bactérienne au sein de ce dernier et des cellules phagocytaires de la muqueuse intestinale provoque alors la stimulation continue des réponses Th1 et Th17. La translocation de bactéries et de leurs antigènes va induire la sécrétion permanente des cytokines pro-inflammatoires ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1b, IL-23, IL-6 et IL-12) qui conduit à une inflammation chronique et des lésions tissulaires.

## II.2. Dysbiose du microbiote chez les patients atteints des MICI

Le rôle important du microbiote dans la pathogénèse et la persistance des MICI est soutenu, d'une part, par la localisation de l'inflammation dans les segments intestinaux abritant les plus fortes densités bactériennes comme l'iléon distal et le côlon et, d'autre part, par l'amélioration des symptômes chez les patients après un traitement antibiotique (Feller et al., 2010; Prantera and Scribano, 2002). De nombreuses études réalisées sur des modèles animaux ont également mis en évidence le rôle du microbiote dans le développement des MICI. Les souris déficientes pour IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>) et pour IL-12 (IL-12<sup>-/-</sup>) élevées dans des conditions conventionnelles développent une colite spontanée alors qu'elles ne présentent pas d'inflammation intestinale dans les conditions stériles (Sellon et al., 1998).



**Figure 30 : Changement de la composition du microbiote chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Spor A, Nature Reviews/Microbiology 2011).**

Répartition des *phyla* bactériens retrouvés dans les prélèvements caecaux d'individus sains ou des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

De plus, des modifications dans la composition du microbiote intestinal, appelées dysbioses, ont été observées chez les patients atteints de MICI (Kassinen et al., 2007) (**Figure 30**). L'altération majeure observée est une réduction de la biodiversité des Firmicutes (groupe de *Clostridium leptum* et *Clostridium coccoides*). Cette diminution est accompagnée d'un enrichissement en Protéobactéries et une disparition de certaines espèces comme *Faecalibacterium prausnitzii* chez les patients atteints de MC ou de RH (Sokol et al., 2009). Il a été rapporté que ces patients présentent une augmentation des entérobactéries, une diminution des bifidobactéries et la présence d'une forte densité des bactéries potentiellement pro-inflammatoire (*E.coli* entéroadhérentes et entéroinvasives) (Seksik et al., 2003; Sokol et al., 2006). De nombreuses études ont montré que les patients atteints des MICI présentent un nombre plus élevé d'espèces bactériennes potentiellement pro-inflammatoire (*Bacteroides*

*vulgatus* et *E. coli*) ainsi qu'une diminution dans la diversité de Firmicutes (*F. prausnitzii*) et d'espèces bactériennes bénéfiques comme les bifidobactéries (Rehman et al., 2010; Sokol et al., 2009; Tamboli et al., 2004). Cette modification de la composition du microbiote a évidemment un impact fonctionnel pour l'épithélium intestinal. En effet, l'abondance des bactéries sulfato-réductrices dans les RH favorise la production de sulfure d'hydrogène, ce qui bloque l'utilisation du butyrate par les colonocytes (Roediger, 1993; Smith et al., 2005). De plus, la diminution des Lachnospiraceae conduit à une production insuffisante de butyrate et les autres AGCC qui servent de substrats énergétiques pour les colonocytes. C'est sans doute pourquoi les teneurs en AGCC dans les fèces de patients atteints de MICI sont diminuées (Marchesi et al., 2007).

### **II.3. Utilisation de bactéries bénéfiques dans le traitement des MICI**

L'utilisation de probiotiques et prébiotiques a été évaluée comme alternative thérapeutique dans le traitement de certaines MICI. Il a été montré que les probiotiques peuvent moduler la composition du microbiote intestinal et favoriser un retour progressif à l'homéostasie. En effet, ils peuvent provoquer des changements dans la composition bactérienne altérée (Fuller, 1989). Une augmentation de la diversité des lactobacilles du côlon a été observée après ingestion de *L. casei* et *L. plantarum* chez la souris (Fuentes et al., 2008). De même, chez les personnes âgées, la consommation de *B. lactis* HN019 augmente le nombre de bifidobactéries résidentes et réduit le nombre d'entérobactéries (Ahmed et al., 2007).

Il a été montré que le mélange de VSL#3 est capable de moduler la diversité du microbiote intestinal chez des patients atteints de pouchite (inflammation chronique idiopathique du réservoir iléal) (Kuhbacher et al., 2006). Le lait fermenté avec des bifidobactéries réduit le nombre de *B. vulgatus* intestinaux chez des patients atteints de RH (Ishikawa et al., 2003).

En plus de la modulation du microbiote intestinal, les probiotiques peuvent exercer d'autres effets bénéfiques pour améliorer certaines MICI. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer leur effet anti-inflammatoire. Parmi ces mécanismes, on trouve la stimulation de la production de mucines qui agissent sur l'attachement, l'adhésion puis l'élimination des micro-organismes pathogènes (Caballero-Franco et al., 2007; Mack et al., 1999). La sécrétion de produits antimicrobiens peut être stimulée en particulier les bactériocines pour neutraliser les pathogènes (Fayol-Messaoudi et al., 2005). Les probiotiques modulent également la réponse immune des cellules épithéliales et immunitaires. Elles inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires (Borrueel et al., 2002; Pena et al.,

2005), et activent la réponse immunorégulatrice (Dalmasso et al., 2006; Di Giacinto et al., 2005; Fedorak and Madsen, 2004).

L'utilisation de bactéries recombinantes produisant des molécules actives est une approche tout aussi pertinente. Les IL-10 produites par des lactocoques recombinants diminuent d'une façon efficace la colite expérimentale chez l'animal (Steidler et al., 2000). Cette cytokine a été aussi utilisée dans une petite cohorte de patients atteints de MC et a réussi à diminuer l'activité de la maladie (Braat et al., 2006).

### III. Composants bactériens aux effets immunomodulateurs

De nombreuses études se sont intéressées à l'identification des composés et métabolites bactériens impliqués dans des effets anti-inflammatoires de certaines bactéries commensales et probiotiques.

#### III.1. ADN

L'ADN bactérien et ses motifs CpG peuvent présenter un rôle dans l'atténuation de l'inflammation chez l'homme et la souris. En présence de stimuli pro-inflammatoire, l'ADN isolé du mélange VSL#3 diminue l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et inhibe la sécrétion d'IL-8 dans les cellules épithéliales HT-29. De plus, l'administration orale de l'ADN de ce mélange bactérien diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-8) et la sévérité de la colite chez les souris IL10<sup>-/-</sup> (Jijon et al., 2004).

Les séquences d'ADN contenant des motifs CpG non méthylés, retrouvés dans le génome de certaines espèces bactériennes activent l'immunité innée *via* le TLR9. Il a été montré que l'administration intragastrique ou sous-cutanée de l'ADN non méthylé de VSL#3 prévient la colite induite au DSS chez les souris *via* le TLR9 (Rachmilewitz et al., 2004).

#### III.2. Composants de surface

De nombreuses études ont démontré que certains composants de surface des bactéries ont une activité anti-inflammatoire. En effet, le polysaccharide A (PSA) de la bactérie commensale *Bacteroides fragilis* exerce un effet protecteur dans des modèles de colite expérimentales en augmentant la sécrétion d'IL-10 *via* la génération de Treg FoxP<sup>3+</sup> (Mazmanian et al., 2008; Round and Mazmanian, 2010). Les acides lipoteichoïques (LTA) peuvent aussi présenter des effets immunomodulateurs. Il a été montré qu'une mutation affectant la biosynthèse des acides téichoïques modifie le profil immunomodulateur de la souche *Lacobacillus plantarum* NCIMB8826 en augmentant ses capacités anti-inflammatoires *in vitro* sur des cellules humaines et *in vivo* dans le modèle de colite induite au TNBS

(Grangette et al., 2005). De plus, la même équipe a récemment montré que le peptidoglycane purifié de la souche *Lactobacillus salivarius* Ls33 protège les souris de la colite induite au TNBS. Les capacités anti-inflammatoires de ce peptidoglycane sont corrélées à la présence d'un mucopeptide (M-tri-Lys) (Fernandez et al., 2011). Le complexe polysaccharide-peptidoglycane de *L. casei* Shirota inhibe la production d'IL-6 par des PBMCs de patients atteints de RH stimulées par le LPS (Matsumoto et al., 2009).

Enfin, des protéines de surface de certains probiotiques peuvent présenter des capacités protectrices. Les protéines exprimées à la surface des souches de *L. delbrueckii* semblent être responsables des effets anti-inflammatoires de ces souches. En effet, *L. delbrueckii* perd ces propriétés inhibitrices de la voie NF- $\kappa$ B après un traitement avec de la trypsine (Santos Rocha et al., 2011).

### III.3. Surnageants de culture

Certains produits du métabolisme bactérien sont aussi incapables de réguler l'inflammation. Le surnageant de culture de la bactérie commensale *F. prausnitzii* diminue la sévérité de la colite chez des souris traitées au TNBS. Cette diminution est corrélée avec l'induction de l'IL-10 et la réduction de TNF- $\alpha$  et d'IL-12. Ce surnageant inhibe également la sécrétion d'IL-8 et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B chez les cellules Caco-2 stimulées par IL-1 $\beta$  (Sokol et al., 2008). Les produits de sécrétion de *Bifidobacterium breve* C50 et *Streptococcus thermophilus* 065 répriment la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules mononucléées humaines ou de cellules épithéliales (Heuvelin et al., 2009; Menard et al., 2004). Le surnageant de *B. breve* C50 protège aussi les souris d'une colite induite au TNBS. De plus, dans les modèles de colites spontanées ou induites au DSS, le gavage des souris avec les surnageants de *L. plantarum* et *L. brevis* ou de *Bifidobacterium infantis*, atténue l'inflammation chez ces animaux (Ewaschuk et al., 2008; Lee, 2008). Néanmoins la nature exacte de ces facteurs solubles n'a pas été identifiée à ce jour. En revanche, certaines études ont réussi à caractériser les métabolites bactériens responsables des effets anti-inflammatoires. Le butyrate, a été l'un des premiers produits identifiés pour la régulation des réponses inflammatoires. Il diminue l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) au niveau des biopsies intestinales de patients atteints de la MC. Cet effet est observé après addition du butyrate *ex vivo* (Segain et al., 2000) ou après supplémentation orale (4g/jour) (Di Sabatino et al., 2005). De plus une déficience en butyrate et en transport de ce dernier a été observé chez des patients atteints de MICI (Thibault et al., 2009; Thibault et al., 2007)

## Contexte et objectifs

Le microbiote du tractus digestif humain joue un rôle primordial dans l'homéostasie intestinale et la santé de l'homme. Ce microbiote considéré comme un organe de l'hôte à part entière contient  $10^{14}$  bactéries qui vivent en symbiose avec l'homme sain. Durant des millions d'années de co-évolution, l'hôte a développé une réponse immunitaire complexe pour contrôler cet écosystème microbien. Ainsi, le microbiote contribue à la maturation du tractus digestif, au développement du système immunitaire et à la régulation de l'homéostasie intestinale (Leser and Molbak, 2009). Ces nombreuses fonctions sont essentielles au maintien de notre santé. L'identification des bactéries présentes, mais également l'accès à l'ensemble des gènes du microbiote intestinal devrait aboutir à la découverte de nouvelles fonctions, permettant de mieux comprendre son rôle dans le maintien de la santé, et expliquer son implication dans certaines pathologies.

### I. Contexte

Les deux équipes que j'ai intégrées sont impliquées dans le projet MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) coordonné par S.D. Ehrlich. Ce projet qui étudie les liens fonctionnels entre le microbiote et son hôte a pour objectif d'établir des associations entre des bactéries, des gènes ou des fonctions et des maladies humaines comme l'obésité et les maladies inflammatoires de l'intestin.

L'une des thématiques de notre équipe dans le contexte de l'homéostasie des interactions entre le microbiote et son hôte, est d'étudier le dialogue qui s'établit entre les bactéries commensales et l'hôte. Pour définir les gènes et caractériser les fonctions impliquées dans ce dialogue, notre équipe travaille sur une bactérie commensale modèle *Streptococcus salivarius* dont certaines spécificités sont le signe d'un échange particulier avec son hôte et probablement d'un rôle important dans la santé humaine. Cette bactérie fait partie des streptocoques du groupe salivarius composés de bactéries alimentaires (*Streptococcus thermophilus*) et de bactéries commensales humaines (*S. salivarius* et *S. vestibularis*) (Facklam, 2002). *S. salivarius* est l'une des premières espèces commensales qui s'implante dans la cavité buccale quelques heures après la naissance et se retrouve dès le 3<sup>ème</sup> jour dans le tractus digestif (Hakalehto et al., 2011a; Park et al., 2005). Elle est l'une des espèces majeures de la cavité buccale tout le long de la vie (Kononen et al., 2002), et récemment, notre équipe a montré sa présence en sous dominance dans le côlon (données MetaHit :  $10^5$ - $10^8$  bactéries/g de fèces).

De nombreuses études ont rapporté des effets biologiques bénéfiques de *S. salivarius* dans la santé humaine. Des travaux menés sur l'écologie buccale montrent le rôle central de *S. salivarius* dans l'équilibre du microbiote de cet écosystème. Plusieurs souches isolées chez l'homme au niveau du pharynx protègent contre la colonisation par les pathogènes respiratoires. En effet la souche TOVE-R présente des propriétés antagonistes sur les streptocoques virulents comme *S. mutans*, *S. sobrinus* et *S. pyogenes* impliqués dans des périodontites et des caries dentaires (Tanzer et al., 1985), et d'autres pathogènes responsables des périodontites (Sliepen et al., 2009a; Van Hoogmoed et al., 2008). Ces propriétés dépendent de la production de bactériocines capables de neutraliser *S. pyogenes* ou *S. pneumonia* (Birri et al., 2011; Santagati et al., 2012a; Walls et al., 2003). De plus, *S. salivarius* inhibe la prolifération de la levure *Saccharomyces albicans* (Zhang et al., 2011). Actuellement, l'isolat K12 de cette bactérie est utilisé comme "probiotique" pour restaurer la balance de la flore microbienne buccale dans les cas d'halitose et prévenir les pharyngites bactériennes dues à *Streptococcus pyogenes* (Wescombe et al., 2006). Cet isolat a reçu le statut « GRASS» par le FDA (Food and Drug Administration) est utilisée comme probiotique en protection buccale (Burton et al., 2011b).

En plus de cette activité antimicrobienne, *S. salivarius* présente un rôle important dans la réponse immunitaire de l'hôte. Certaines souches comme TOVE-R, PZ86, et K12 réduisent la réponse inflammatoire induite par un pathogène. En effet, ces souches répriment l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la sécrétion d'IL-8 induite par *Yersinia enterocolitica* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Frick et al., 2007a; Frick et al., 2007b; Sliepen et al., 2009a). De plus, des études ont montré que *S. salivarius* modulait la réponse immunitaire de cellules épithéliales humaines (Cosseau et al., 2008). En réponse à une stimulation par cette bactérie, les cellules épithéliales modulent l'expression de nombreux gènes comme ceux impliqués dans des propriétés de structure, d'adhésion et dans la réponse immunitaire innée (Cosseau et al., 2008). L'ensemble de ces travaux converge vers l'implication de *S. salivarius* dans l'homéostasie avec l'hôte.

## II. Objectifs

Le but de ce travail de thèse a été d'étudier les propriétés immunomodulatrices des bactéries commensales du groupe salivarius (*S. salivarius* et *S. vestibularis*), et ainsi, d'évaluer la contribution de *S. salivarius* dans la balance immunitaire. Des effets de bactéries commensales sur la réponse inflammatoire, associés pour la plupart à une régulation de la

voie NF- $\kappa$ B, ont déjà été rapportés. NF- $\kappa$ B est une voie de signalisation particulièrement importante dans la réponse immunitaire où elle est induite par des signaux extracellulaires comme des composés microbiens et des cytokines pro-inflammatoires. A travers une série en cascade de transduction du signal, elle contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Notre premier objectif a été d'évaluer l'aptitude des souches de *S. salivarius* et *S. vestibularis*, à moduler l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans des cellules humaines (type épithéliale et monocyte). Nous avons montré que les surnageants bactériens étaient capables de réprimer l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Focalisant nos travaux sur trois souches parmi les plus actives, nous avons mis en évidence que les effets anti-inflammatoires de *S. salivarius* sont spécifiques aux bactéries métaboliquement actives. Notre deuxième objectif a été de confirmer *in vivo* ces propriétés immunomodulatrices. Ce travail, réalisé en collaboration avec l'équipe « Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses » de l'Institut Pasteur de Lille sous la direction de Catherine Daniel, a consisté à tester l'effet de la souche anti-inflammatoire la plus active sur un modèle murin présentant une inflammation digestive de type colite, induite au TNBS. Le troisième objectif de cette étude a été d'identifier *in vitro* les mécanismes par lesquels *S. salivarius* était capable de moduler la réponse immunitaire des cellules épithéliales en situation inflammatoire. Enfin, nous nous sommes intéressés avec l'aide d'Alain Guillot de la plateforme « PAPPISO », à l'identification et la caractérisation de cette ou ces molécule(s) au potentiel anti-inflammatoire.

# *Résultats*

# Résultats

## I. Liste des publications

### I.1. Article 1

**Ghalia Kaci**,<sup>1</sup> Omar Lakhdari,<sup>2</sup> Joël Doré,<sup>2</sup> S. Dusko Ehrlich,<sup>1</sup> Pierre Renault,<sup>1</sup> Hervé M. Blottière,<sup>2†\*</sup> and Christine Delorme<sup>1†\*</sup>

Inhibition of the NF-kappaB pathway in human intestinal epithelial cells by commensal *Streptococcus salivarius*. (Publier dans AEM **2011** Jul;77(13):4681-4. Epub **2011** May 20)

### I.2. Article 2

**Ghalia Kaci**<sup>1,2</sup>, Denise Goudercourt<sup>3</sup>, Véronique Dennin, Bruno Pot<sup>3</sup>, J. Doré<sup>1,2</sup>, S. Dusko Ehrlich<sup>1,2</sup>, Pierre Renault<sup>1,2</sup>, Hervé M. Blottière<sup>1,2</sup>, Catherine Daniel<sup>3,4</sup> and Christine Delorme<sup>1,2,4</sup>.

Anti-inflammatory properties of *Streptococcus salivarius* a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract (en préparation pour soumission dans IBD)

## II. Autres résultats

**II.1. Caractérisation du composé anti-inflammatoire sécrété par la bactérie commensale *Streptococcus salivarius***

**II.2. Mécanisme d'action du composé inhibiteur de la voie NF-κB, sécrété par la bactérie commensale *Streptococcus salivarius***

## I.1. Article N°1: Inhibition of the NF-kappaB pathway in human intestinal epithelial cells by commensal *Streptococcus salivarius*.

(Publiée dans AEM 2011 Jul;77(13):4681-4. Epub 2011 May 20)

---

**Ghalia Kaci,<sup>1</sup> Omar Lakhdari,<sup>2</sup> Joël Doré,<sup>2</sup> S. Dusko Ehrlich,<sup>1</sup> Pierre Renault,<sup>1</sup> Hervé M. Blottière,<sup>2†\*</sup> and Christine Delorme<sup>1‡\*</sup>**

**Objectif :** *Streptococcus salivarius* est l'un des premiers colonisateurs de la cavité buccale et du tractus digestif de l'homme. Cette bactérie contribue au maintien de l'homéostasie immunitaire et à la régulation de la réponse inflammatoire de son hôte. L'objectif de cette étude est d'analyser l'effet immunomodulateur d'une collection de souches de *S. salivarius* et *S. vestibularis* via la régulation de la voie NF-κB.

**Méthodes :** Des cellules épithéliales humaines (HT-29 et Caco-2) et des monocytes (THP-1) ont été utilisées. Ces cellules sont transfectées d'une manière stable avec des gènes rapporteurs (luciférase ou SEAP) pour l'activation de la voie NF-κB.

**Résultats :** Les surnageants de 41 souches (32 *S. salivarius* et 9 *S. vestibularis*) inhibent de 30 à 70% l'activation de la voie NF-κB induite par le TNFα dans les cellules épithéliales HT-29/kB-luc-E. Cet effet répresseur est souche-dépendant et dépend d'un composé de masse moléculaire < 3kDa sécrété par *S. salivarius* lors de la croissance bactérienne et qui s'accumule dans le milieu de culture. Ce(s) composé(s) inhibe(ent) aussi la voie NF-κB des cellules HT-29 induites l'IL-1β ou la flagelline, mais également celle, de la lignée épithéliale Caco-2 et la lignée monocyttaire THP-1. Comme attendu, les surnageants sont capables de réduire la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 induite suite à l'activation de NF-κB par le TNFα.

**Conclusion :** *S. salivarius*, une bactérie commensale, produit et sécrète un composé actif capable d'inhiber une des voies centrales de signalisation impliquée dans la réponse inflammatoire au niveau de l'épithélium intestinal.

## Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway in Human Intestinal Epithelial Cells by Commensal *Streptococcus salivarius*<sup>∇†</sup>

Ghalia Kaci,<sup>1</sup> Omar Lakhdari,<sup>2</sup> Joël Doré,<sup>2</sup> S. Dusko Ehrlich,<sup>1</sup> Pierre Renault,<sup>1</sup>  
Hervé M. Blottière,<sup>2‡\*</sup> and Christine Delorme<sup>1‡\*</sup>

Commensal and Food Bacteria Group<sup>1</sup> and Functionality of the Intestinal Ecosystem Group,<sup>2</sup> INRA,  
UMR1319 Micalis, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas, France

Received 24 December 2010/Accepted 9 May 2011

***Streptococcus salivarius* exhibited an anti-inflammatory effect on intestinal epithelial cells (IECs) and monocytes. Strains were screened using a reporter clone, HT-29/ $\kappa$ B-luc-E, induced by tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Supernatant from each strain downregulated NF- $\kappa$ B activation. The two most efficient strains produced an active metabolite (<3 kDa) which was able to downregulate the secretion of the proinflammatory chemokine interleukin-8 (IL-8).**

The intestinal microbiota consists of more than 10<sup>14</sup> bacteria living in a symbiotic relationship with their host. Commensal microorganisms contribute to host health by supplying nutrition, preventing pathogen colonization, and maintaining intestinal homeostasis. The microbial inhabitants contribute to the maturation of the gastrointestinal tract and its immune system by shaping and maintaining normal mucosal immunity (20). These properties underline the existence of an extensive cross talk between the commensal bacteria and the gut mucosa to maintain beneficial relationships and tolerogenic host response (21). The intestinal epithelial cells (IECs) represent the first point of contact for bacteria within the gut, preventing microbial penetration and eliciting first communication for immune recognition of commensal bacteria. Keeping a balance between tolerant response and aberrant inflammation is the main goal of the cross talk between commensal bacteria and IECs in the digestive tract (1, 20).

In an inflammatory context, several commensal and probiotic bacteria have been shown to modulate mucosal innate immune response and reduce the inflammatory signaling cascade (7). *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species have been shown to reduce inflammatory responses, including NF- $\kappa$ B activation and interleukin-8 (IL-8) production, in various models of intestinal epithelial cells (2, 16, 28). Interestingly, the immunomodulation capacities of commensal species from the intestinal microbiota established on IECs are correlated with anti-inflammatory effects *in vivo* (6, 9, 12, 13, 25, 29). Although close contact between live commensal bacteria and eukaryotic cells leads to many biological activities, some secreted bacterial

factors have been characterized as responsible for anti-inflammatory effect (8, 17). These bacterial products may be proposed as tools for prevention and/or treatment of human inflammatory bowel diseases.

Several mechanisms underlying the beneficial effects of commensal and probiotic bacteria identified *in vitro* involve a downregulation of the NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional activity. NF- $\kappa$ B is a dimeric transcription factor whose activation is connected by signaling cascade to several receptors, including Toll-like receptors (TLRs). The different steps of the NF- $\kappa$ B signaling pathway represent potential targets for anti-inflammatory probiotic and commensal bacteria to weaken NF- $\kappa$ B activation and thereby prevent its transcriptional activity. An inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway is observed with targeting genes involved in ubiquitination and proteasome processes by *Lactobacillus casei* anti-inflammatory effect (28), through interference with I $\kappa$ B $\alpha$  degradation of nonpathogenic *Salmonella* strain effect (14, 18), in the cellular phosphorylation step of the NF- $\kappa$ B pathway by interference with soluble factor of *Bifidobacterium breve* (9), and finally, in the nuclear export of NF- $\kappa$ B subunit RelA by *Bacteroides thetaiotamicron* (12).

The commensal bacterium *Streptococcus salivarius* is one of the early colonizers of oral mucosal surfaces a few hours after birth. This species remains prevalent in the oral cavity and subprevalent in the digestive tract throughout the life span and plays an important role in oral ecology. *S. salivarius* displays protective effects against pathogens involved in development of tooth decay and periodontitis (26, 27). It influences the inflammatory responses triggered by periodontopathogens and enteric pathogens (8, 24). Recently, the commensal strain *Streptococcus salivarius* K12 was shown to attenuate NF- $\kappa$ B activation, suggesting a role of this bacterium in inflammation (3). We investigated the regulatory effects of *S. salivarius* strains on the NF- $\kappa$ B pathway in human IECs. We used NF- $\kappa$ B reporter systems stably expressed in HT-29 (ATCC HTB-38) to analyze the effects of different strains of *S. salivarius* on NF- $\kappa$ B activation. Five repeats of the NF- $\kappa$ B binding site were cloned in the luciferase reporter plasmid pGL3 enhancer vector (Promega). The obtained plasmid was cotransfected with pTK-Hyg plasmid, a hygromycin selection vector (Clontech),

\* Corresponding author. Mailing address for Hervé M. Blottière: Functionality of the Intestinal Ecosystem Group, INRA, UMR1319 Micalis, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas, France. Phone: 33 1 34 65 23 19. Fax: 33 1 34 65 24 92. E-mail: herve.blottiere@jouy.inra.fr. Mailing address for Christine Delorme: Commensal and Food Bacteria Group, INRA, UMR1319 Micalis, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas, France. Phone: 33 1 34 65 25 26. Fax: 33 1 34 65 25 21. E-mail: christine.delorme@jouy.inra.fr.

‡ H.M.B. and C.D. contributed equally to this work.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 20 May 2011.

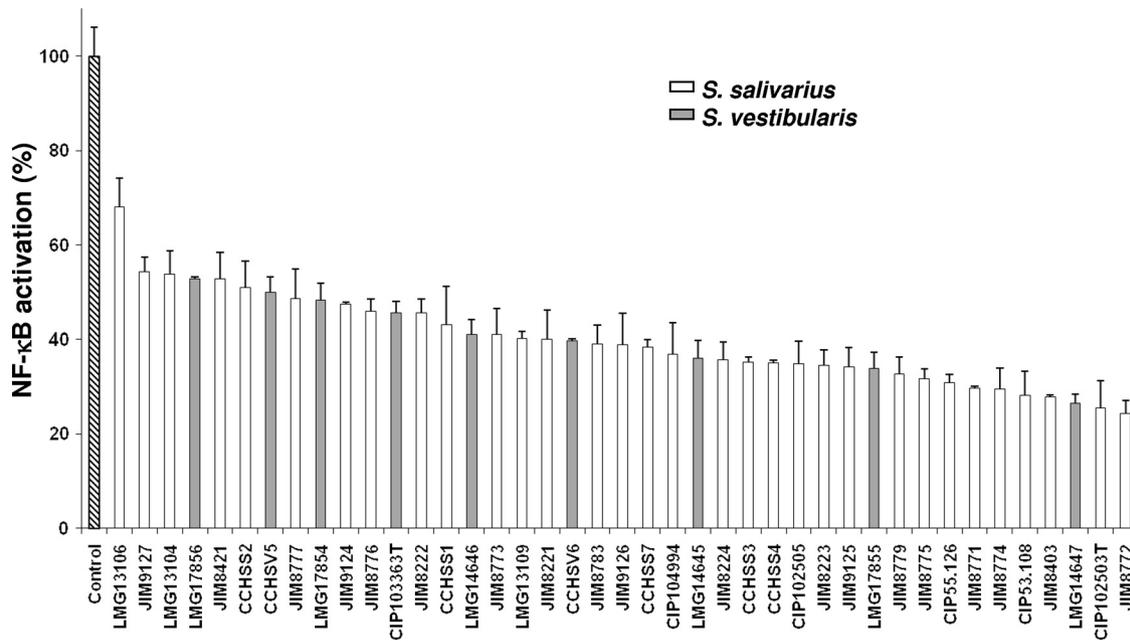


FIG. 1. Effect of the supernatants (Sn) of different strains of *S. salivarius* and *S. vestibularis* on TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation in HT-29/kB-luc-E. Luciferase activity was measured after addition of Sn to HT-29/kB-luc-E reporter cells in the presence of TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). The control assay corresponds to luciferase activity obtained with HT-29/kB-luc-E reporter cells in the presence of M17 bacterial growth medium with adjusted pH and TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). Results are expressed as relative percentages of NF- $\kappa$ B activation compared to the control assay (100%). Results are represented by means  $\pm$  standard deviations of triplicate measurements from one representative experiment out of a minimum of three independent experiments performed. Data were analyzed by Student's *t* test ( $P < 0.05$  compared to control for all tested supernatants). Results from *S. salivarius* (white bars) and *S. vestibularis* (gray bars) are classified by increasing inhibition strength.

in HT-29 cells using TFX-50 (Promega) according to the manufacturer's instructions. After 3 weeks under hygromycin (200  $\mu$ g/ml), the HT-29/kB-luc-E clone was selected for its response to tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ; 10 ng/ml; Peprotech). For each experiment, HT-29/kB-luc-E reporter cells were seeded at 50,000 cells per well into 96-well plates and incubated for 48 h in RPMI (Sigma) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Lonza) in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C, before stimulation (6 h) with TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). The supernatants (Sn) of 9 strains of *Streptococcus vestibularis* and 32 strains of *S. salivarius* were tested to determine whether the property to modulate inflammatory response was widely distributed in these species. The strains used in this work were previously described (5) and were grown on M17 (at 37°C) supplemented with glucose (0.5 g/liter). *S. salivarius* and *S. vestibularis* bacterial supernatants were collected by centrifugation of cultures and filtered through 0.22- $\mu$ m filters. Stimulated cells were tested with each supernatant (10%, vol/vol) or with M17 medium adjusted to pH  $\sim$ 5.5 (pH at the end of the bacterial culture) as a control. Luciferase activity was measured using the luciferase assay system (Promega) and a microplate reader (Infinite 200; Tecan). Relative luminescence units (RLU) are expressed as relative percentage of NF- $\kappa$ B activation compared to positive control, i.e., cells stimulated with growth medium plus the NF- $\kappa$ B activator.

Supernatants of *S. salivarius* and *S. vestibularis* strains markedly inhibited TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation (Fig. 1). The inhibition rate, ranging from 30 to 70%, suggested that an

active metabolite modulating the inflammatory response was produced and released in the culture medium. The supernatants of JIM8772 and CIP102503<sup>T</sup> strains, presenting higher activity, were selected to characterize the bacterial molecular factor involved in this modulation. We demonstrated by dilution of these two supernatants that the effect is dose dependent. Indeed, compared to the 70% inhibition obtained with the CIP102503<sup>T</sup> supernatant, inhibitions of 60%, 30%, and 20% of NF- $\kappa$ B were observed when the supernatant was diluted to 3/4, 1/2, and 1/4, respectively. Similar results were obtained using dilutions of JIM8772 supernatant (data not shown).

Several experiments were then performed to characterize the nature of the active compound(s) released by *S. salivarius*. First, we ruled out that the inhibitory effect was due to bacterial metabolites such as butyric and lactic acid that have previously been shown to regulate the NF- $\kappa$ B pathway in several cell lines, including human IECs (10, 11, 22). High-pressure liquid chromatography (HPLC) measurement of organic acids revealed 80 mM lactic acid and the absence of butyrate in *S. salivarius* supernatant (data not shown). Consequently, we tested the effect of a wide range of concentrations of lactic acid (20 to 120 mM). At these concentrations, lactic acid did not affect NF- $\kappa$ B activation (data not shown). Lastly, *S. salivarius* supernatants had no effect on the baseline NF- $\kappa$ B activity and did not affect cell viability as controlled using the MTS assay (Promega) (data not shown).

To determine the size and the nature of the active component(s) present in *S. salivarius* supernatant, we tested the inhibitory activity after passage through 10-kDa- and 3-kDa-

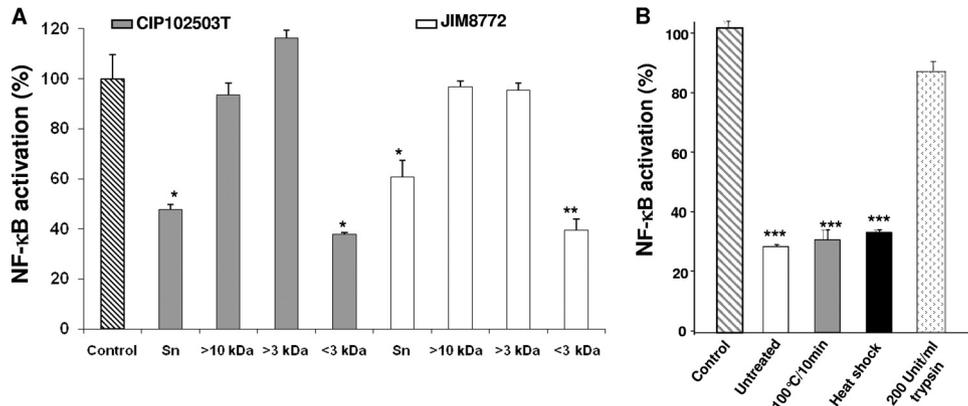


FIG. 2. Determination of molecular mass and nature of the active component secreted by *S. salivarius*. (A) Fractions were obtained after filtrations of *S. salivarius* CIP102503<sup>T</sup> Sn (gray bars) and JIM8772 Sn (white bars) after CDM growth through selective membranes. Retained fractions containing metabolites of >10 kDa and >3 kDa and filtered fraction containing metabolites of <3 kDa were tested for inhibition of NF-κB transcription activity in HT-29/kB-luc-E cells. (B) *S. salivarius* JIM8772 <3-kDa Sn was treated by exposure to high temperature (100°C for 10 min), to heat shock (100°C for 10 min before freezing in liquid nitrogen), or to trypsin hydrolysis (200 U/ml). Results are from one representative out of at least three independent experiments. *P* values were <0.05 (\*), <0.025 (\*\*), or <0.01 (\*\*\*) compared to control for the two tested strains. Bars represent standard deviations of the means.

cutoff columns. To facilitate the purification process, strains were grown on chemically defined medium (CDM) (23) supplemented with 0.5 g/liter ascorbic acid, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, β-glycerophosphate (disodium salt, 6 g/liter), and glucose (0.5 g/liter). Bacterial supernatants were submitted to ultrafiltration through Centrplus YM-3 or YM-10 membranes that retain molecules larger than 3 or 10 kDa, respectively. For both strains, the <3-kDa fraction inhibited NF-κB activity by 60% while retained fractions (>10 kDa and >3 kDa) displayed no effect (Fig. 2A). Furthermore, a trypsin treatment (200 U/ml; Mag-Trypsin; Ozyme) of the <3-kDa fraction resulted in a drastic loss of the inhibitory effect, with only ~15% remaining inhibition (Fig. 2B). These results suggest that the partially purified active compound of a molecular mass lower than 3 kDa contained peptidic bonds. Exposure to high temperatures (100°C for 10 min) or to heat shock (100°C for 10 min before freezing in liquid nitrogen) did not affect the inhibitory potential. The compound's resistance to heat treatments confirmed that it is a small molecule that may not display a complex folding. Taken together, these results suggest that *S. salivarius* strains mediated their anti-inflammatory effects through the release of a low-molecular-weight component of peptidic nature.

The inhibitory effects of the *S. salivarius* supernatant on the NF-κB pathway were confirmed on the production of interleukin-8 (IL-8) as assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Eli-Pair; Diaclone). Both JIM8772 and CIP102503<sup>T</sup> supernatants and their corresponding <3-kDa fractions provoked a drastic decrease of IL-8 secretion induced by TNF-α (Fig. 3). The inhibitory effects were similar between raw and fractionated supernatants, with inhibition rates of 75% and 55% for CIP102503<sup>T</sup> and JIM8772, respectively.

JIM8772 and CIP102503<sup>T</sup> <3-kDa supernatants were also tested on NF-κB activation in the monocyte-like cell clone THP-1 blue (Invivogen) and the colonic epithelial cell clone Caco-2/kB-seap-7 (15), both bearing an NF-κB reporter system with secreted alkaline phosphatase (SEAP) as reporter gene. SEAP was revealed using Quanti-Blue reagent (Invivo-

gen). JIM8772 and CIP102503<sup>T</sup> <3-kDa fraction supernatant led to 40% and 20% inhibition of NF-κB activity on THP-1 reporter cells after activation with lipopolysaccharide (LPS) or TNF-α, respectively (see Fig. S1A in the supplemental material). Similarly, the two fractions induced a 60% inhibition of NF-κB activity in Caco-2/kB-seap-7 cells stimulated with IL-1β (see Fig. 1B in the supplemental material). Thus, the effect of *S. salivarius* supernatant is not restricted to epithelial cells but is also observed on monocytic cells. We confirmed the recent studies that have highlighted anti-inflammatory properties of live *S. salivarius* strains *in vitro*. An *S. salivarius* strain was shown to weaken IL-8 production induced by the periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* on human oral epithelial cells (24). Furthermore, *S. salivarius* reduced NF-κB activation and IL-8 production triggered by *Yersinia*

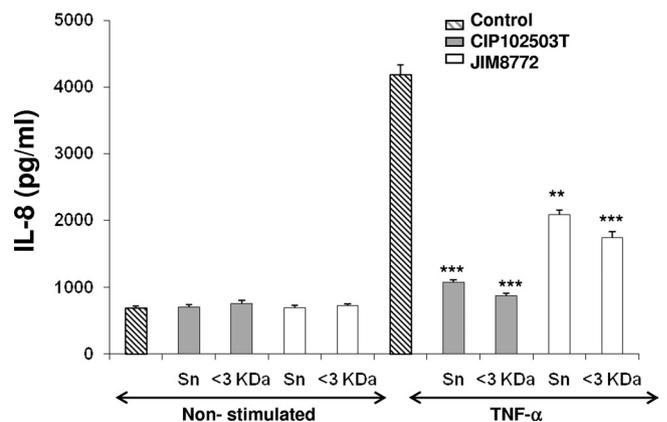


FIG. 3. Effect of *S. salivarius* supernatant (Sn) on IL-8 secretion by HT-29/kB-luc-E cells. HT-29 reporter cells were incubated with *S. salivarius* CIP102503<sup>T</sup> and JIM8772 Sn and the corresponding <3-kDa Sn of both strains after CDM growth, in the presence or absence of TNF-α (10 ng/ml). Results are from one representative out of three independent experiments. *P* values were <0.05 (\*), <0.025 (\*\*), or <0.01 (\*\*\*) compared to control for the two tested strains. Bars represent standard deviations of the means.

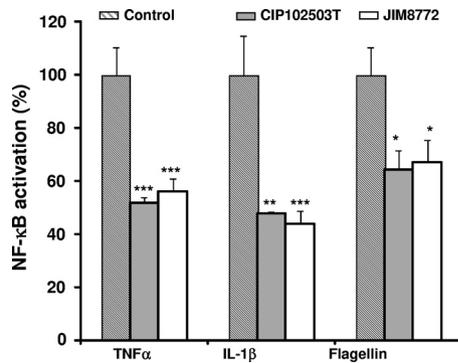


FIG. 4. Effect of *S. salivarius* Sn on NF- $\kappa$ B activation in HT-29/kB-luc-E induced by different inducers. Sn fractions (<3 kDa) from *S. salivarius* JIM8772 (white bars) and CIP102503<sup>T</sup> (gray bars) after CDM growth were added to the HT-29/kB-luc-E cells induced by TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), or flagellin (10  $\mu$ g/ml). Results are from one representative out of three independent experiments. *P* values were <0.05 (\*), <0.025 (\*\*), or <0.01 (\*\*\*) compared to control for the two tested strains. Bars represent standard deviations of the means.

*enterocolitica* in HT-29 cells (8) and by *Pseudomonas aeruginosa* or flagellin in a human bronchial epithelial cell line as well as primary cultures of keratinocytes (3). Beneficial effects on inflammatory response and maintenance of intestinal homeostasis were reported for *Streptococcus thermophilus*, a dairy probiotic bacterium and the third known species belonging to the salivarius group (17, 19). Therefore, these results together with our study suggest that species belonging to the streptococcal salivarius group are presenting beneficial effects on host inflammatory processes. Their phylogenetic nearness suggests that they may share a related metabolite production pathway inherited from their common ancestor (4).

Finally, we showed that the supernatant of *S. salivarius* also inhibited NF- $\kappa$ B activity induced in HT-29 cells with another proinflammatory cytokine, IL-1 $\beta$ , and the TLR5 ligand, flagellin (Fig. 4). Thus, the target of the inhibitory compound seemed localized downstream of the receptors and at a step common to all tested TNF, IL-1, and TLR5 receptors.

In summary, we have shown that all strains from a representative collection of *S. salivarius* and *S. vestibularis* strains inhibited the activation of NF- $\kappa$ B. We partially purified a low-molecular-weight metabolite from *S. salivarius* supernatant that harbored anti-inflammatory properties *in vitro* on IECs as well as immune cells. Thus, *S. salivarius* strains are involved in the molecular cross talk with beneficial potential for the host mucosal immune system. The precise characterization of the active molecule and its mechanism of action will facilitate the development of promising therapeutic strategies for inflammatory disorders, such as the safe use of this metabolite as a drug or the use of *S. salivarius* as a probiotic in oral and intestinal pathologies.

This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique and by the EU MetaHit (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) project HEALTH-F4-2007-201052.

We thank Pascal Courtin for the HPLC analysis of organic acids.

#### REFERENCES

1. Artis, D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:411–420.

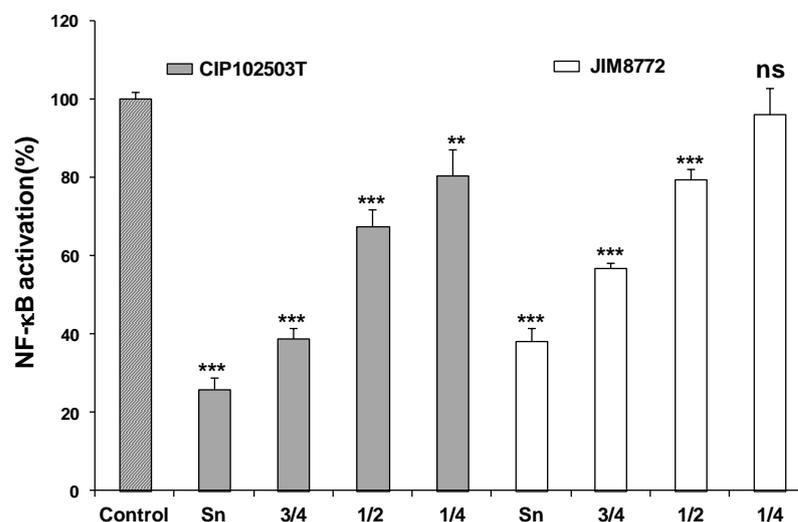
2. Candela, M., et al. 2008. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int. J. Food Microbiol.* **125**:286–292.
3. Cosseau, C., et al. 2008. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 down-regulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect. Immun.* **76**:4163–4175.
4. Delorme, C., C. Bartholini, A. Bolotine, S. D. Ehrlich, and P. Renault. 2010. Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:451–460.
5. Delorme, C., C. Poyart, S. D. Ehrlich, and P. Renault. 2007. Extent of horizontal gene transfer in evolution of streptococci of the salivarius group. *J. Bacteriol.* **189**:1330–1341.
6. Ewaschuk, J. B., et al. 2008. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**:G1025–G1034.
7. Ewaschuk, J. B., and L. A. Dieleman. 2006. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **12**:5941–5950.
8. Frick, J. S., et al. 2007. Identification of commensal bacterial strains that modulate *Yersinia enterocolitica* and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: implications for the development of probiotics. *Infect. Immun.* **75**:3490–3497.
9. Heuvelin, E., et al. 2009. Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by *Bifidobacterium breve* soluble factors. *PLoS One* **4**:e5184.
10. Inan, M. S., et al. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF- $\kappa$ B activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* **118**:724–734.
11. Kellum, J. A., M. Song, and J. Li. 2004. Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**:R686–R692.
12. Kelly, D., et al. 2004. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA. *Nat. Immunol.* **5**:104–112.
13. Kim, S. W., et al. 2010. *Bifidobacterium lactis* inhibits NF- $\kappa$ B in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**:1514–1525.
14. Kumar, A., et al. 2007. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J.* **26**:4457–4466.
15. Lakhdari, O., et al. 2010. Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF- $\kappa$ B modulation in the human gut. *PLoS One* **5**:e13092.
16. Lin, P. W., et al. 2009. *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling *in vivo* via reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:1205–1211.
17. Menard, S., et al. 2004. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* **53**:821–828.
18. Neish, A. S., et al. 2000. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  ubiquitination. *Science* **289**:1560–1563.
19. Resta-Lenert, S., and K. E. Barrett. 2003. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* **52**:988–997.
20. Round, J. L., and S. K. Mazmanian. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**:313–323.
21. Round, J. L., R. M. O'Connell, and S. K. Mazmanian. 2010. Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. *J. Autoimmun.* **34**:J220–J225.
22. Segain, J. P., et al. 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF- $\kappa$ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**:397–403.
23. Sissler, M., et al. 1999. An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic role in histidine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:8985–8990.
24. Sliopen, I., et al. 2009. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J. Dent. Res.* **88**:1026–1030.
25. Sokol, H., et al. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:16731–16736.
26. Tanzer, J. M., A. B. Kurasz, and J. Clive. 1985. Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R. *Infect. Immun.* **48**:44–50.
27. Teughels, W., et al. 2007. Bacteria interfere with *A. actinomycetemcomitans* colonization. *J. Dent. Res.* **86**:611–617.
28. Tien, M. T., et al. 2006. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on Shigella-infected human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **176**:1228–1237.
29. Zoumpoulou, G., et al. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. *Int. J. Food Microbiol.* **121**:18–26.

## Résultats complémentaires de l'article 1

Nos résultats publiés dans l'article 1 ont montré que les surnageants de culture de *S. salivarius* répriment l'activation de la voie NF- $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$  dans les cellules épithéliales HT-29. Cet effet inhibiteur est souche-dépendant et dépend d'un composé actif produit et sécrété dans le milieu de culture par *S. salivarius*. Nous avons mis en évidence qu'un facteur, résistant aux traitements thermiques et présent dans la fraction < 3kDa des surnageants bactériens, inhibe l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Les résultats qui ont permis d'évaluer l'effet inhibiteur du composé actif (i) en fonction de la quantité de surnageant et de la phase de croissance bactérienne, (ii) sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans d'autres lignées cellulaires, n'ayant été que succinctement décrits dans l'article, ont été développés ici.

### 1. L'inhibition de l'activation NF- $\kappa$ B par les surnageants de *S. salivarius* est dose dépendante

Pour évaluer l'effet inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B en fonction de la quantité de surnageant de *S. salivarius*, différentes dilutions des surnageants des souches les plus actives JIM8772 et CIP102503T, sont mises en contact avec les cellules HT-29/kB-luc-E stimulées par le TNF $\alpha$  (**Figure 1**).



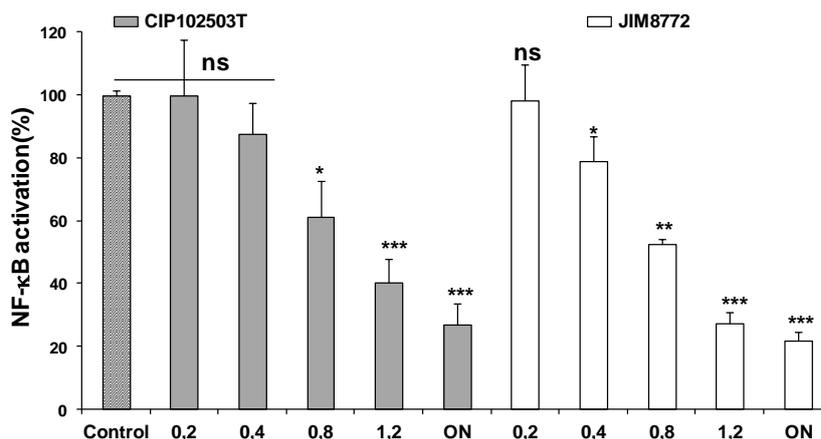
**Figure 1** : Effet des différentes dilutions des surnageant (Sn) de *S. salivarius* JIM8772 et CIP102503T sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules HT-29/kB-luc-E. Les cellules sont incubées avec les surnageants de *S. salivarius* JIM8772, CIP102503T et leurs dilutions (3/4, 1/2 et 1/4) en présence de TNF $\alpha$  (10 ng/ml). Les résultats représentent une des trois expériences indépendantes. p<0.05 (\*), p<0.025 (\*\*), p<0.01 (\*\*\*), p>0.05 (ns). Les histogrammes représentent le pourcentage d'activation de la voie NF- $\kappa$ B par rapport à une activation de 100% obtenue par le contrôle.

Comparée à une inhibition de 70 % d'activation NF- $\kappa$ B obtenue avec le surnageant de CIP102503T, une inhibition de 60 %, 30 % et 20 %, a été observée lorsque le surnageant est dilué respectivement de 3/4, 1/2 et 1/4. Des résultats semblables ont été obtenus en utilisant les

dilutions du surnageant de JIM8772 pour lesquelles les taux d'inhibition de 40 % et de 20 ont été respectivement obtenus avec les dilutions de  $\frac{3}{4}$  et de  $\frac{1}{2}$ , pendant qu'aucun effet significatif est observé avec la plus haute dilution. Ces résultats montrent que l'inhibition de l'activation NF- $\kappa$ B est dépendante de la quantité de composé actif présent dans les surnageants de culture de *S. salivarius*.

## 2. Corrélation de l'effet inhibiteur des surnageants avec la croissance de *S. salivarius*

Puisque l'activité métabolique d'une bactérie est différente durant sa croissance, nous avons étudié comment évolue l'effet inhibiteur des surnageants sur la voie NF- $\kappa$ B en fonction des différentes phases de la croissance de *S. salivarius*. Les surnageants de culture des souches JIM8772 et CIP102503T prélevés à différentes DO sont testés pour leur effet sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules HT-29/kB-luc-E.

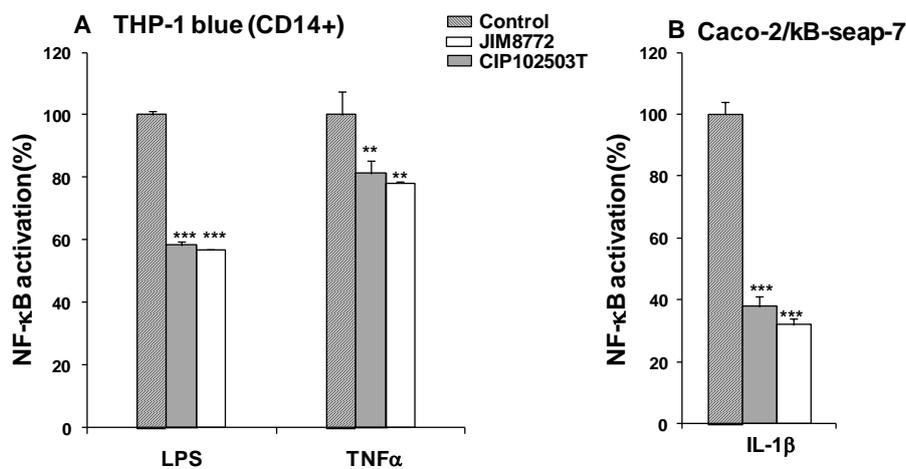


**Figure 2 :** Effet des surnageants de *S. salivarius* JIM8772 et CIP102503T prélevés à différentes DO sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules HT-29/kB-luc-E. Les cellules sont incubées avec les surnageants de *S. salivarius* JIM8772, CIP102503T prélevés à différentes DO de la croissance bactérienne (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, et ON) en présence de TNF $\alpha$  (10ng/ml). Les résultats représentent une des trois expériences indépendantes. p<0.05 (\*), p<0.025 (\*\*), p<0.01 (\*\*\*), p>0.05 (ns). Les histogrammes représentent le pourcentage d'activation de la voie NF- $\kappa$ B par rapport à une activation de 100% obtenue par le contrôle. ON: culture overnight

Comme illustré par la **Figure 2**, la répression de l'activation NF- $\kappa$ B par les surnageants augmente avec le temps de croissance des cultures bactériennes. Ainsi, une inhibition maximale de 70% est observée avec des surnageants prélevés après 12h (DO-ON) correspondait à la phase stationnaire des deux souches testées. Aucun effet n'est obtenu avec les surnageants prélevés en début de phase de croissance (DO entre 0,2 et 0,4). Cet effet répresseur de la voie NF- $\kappa$ B par les surnageant est probablement lié à la sécrétion d'un (des) métabolite(s) par *S. salivarius* qui est (sont) accumulé(s) pendant la croissance bactérienne.

### 3. Effet des surnageants bactériens sur l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules Caco-2 et THP-1

Afin de déterminer si l'effet inhibiteur de NF- $\kappa$ B par le surnageant de *S. salivarius* est efficace sur d'autres lignées cellulaires, nous avons testé l'effet de la fraction surnageant < 3kDa sur l'activation NF- $\kappa$ B dans les monocytes les THP-1 blue™ et dans les cellules épithéliales du côlon les Caco-2/kB-seap-7. Ces deux clones cellulaires contiennent un système rapporteur pour l'activation de NF- $\kappa$ B. Les cellules sont stimulées par le LPS, le TNF $\alpha$ , ou l'IL-1 $\beta$  en fonction de la lignée cellulaire.



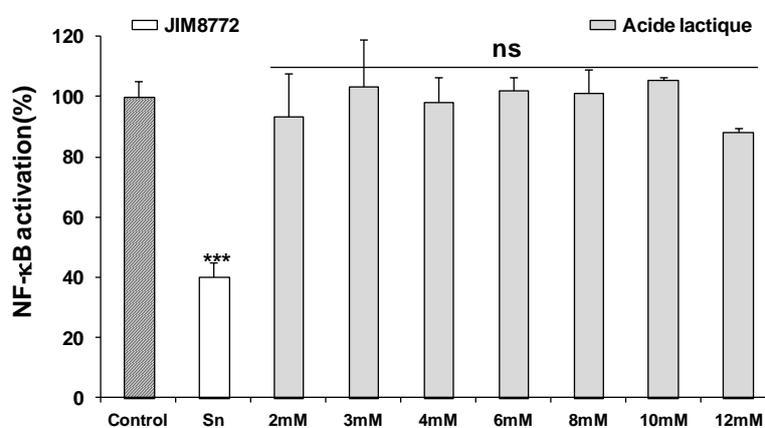
**Figure 3 : Effet du Sn de *S. salivarius* sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules Caco-2/kB-seap-7 et les THP-1 blue.** Les fraction Sn <3kDa de *S. salivarius* JIM8772 (barre blanche) et CIP102503T (barre grise) sont mises en contact avec les différentes lignées cellulaires en présence des différents activateurs. (A) Les THP-1 blue sont induites par TNF $\alpha$  (10 ng/ml) ou LPS (50 $\mu$ g/ml). (B) Les cellules Caco-2/kB-seap-7 sont induites par IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Les résultats représentent une des trois expériences indépendantes. p<0.05 (\*), p<0.025 (\*\*), p<0.01 (\*\*\*). Les histogrammes représentent le pourcentage d'activation de la voie NF- $\kappa$ B par rapport à une activation de 100% obtenue par le contrôle.

Comme montré sur la **Figure 3A**, les fractions < 3kDa des surnageants de JIM8772 et CIP102503T exercent une inhibition sur l'activation NF- $\kappa$ B de 40% et 20% dans les cellules THP-1 stimulées respectivement, par le LPS ou le TNF $\alpha$ . En outre, ces mêmes fractions de surnageants réduisent de 60% l'activation NF- $\kappa$ B induite par l'IL-1 $\beta$  dans les cellules Caco-2/kB-seap-7 (**Figure 3B**). Ainsi, l'effet du surnageant de *S. salivarius* sur l'activation NF- $\kappa$ B n'est pas restreint aux cellules épithéliales, mais est aussi observé sur les cellules monocytaires.

### 4. Inhibition de l'activation NF- $\kappa$ B est indépendante de l'acide lactique

L'objectif de cette expérience était de démontrer si l'acide lactique sécrété par *S. salivarius* pourrait être responsable de l'effet répressur observé. Dans nos conditions de croissance, ce métabolite du catabolisme des sucres est produit par *S. salivarius* à une concentration

d'environ 80 mM (dosage HPLC sur 13 souches). Nous avons donc évalué l'effet d'une gamme de 20 à 120 mM d'acide lactique sur la voie NF- $\kappa$ B activée par le TNF $\alpha$  dans les cellules HT-29/kB-luc-E. Puisque le surnageant de *S. salivarius* est rajouté à un volume de 10% vol/vol sur les cellules, la concentration finale d'acide lactique en contact avec les cellules est comprise entre 2 à 12 mM. A ces concentrations, l'acide lactique n'affecte pas l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (**Figure 4**). De plus, la quantification par HPLC dans les surnageants, des autres acides organiques à chaînes courtes (AGCC) comme le butyrate, le pyruvate, le propionate, l'acétate et le formate, a montré que notre bactérie produit des traces de ces acides. Ces résultats montrent que l'effet inhibiteur de *S. salivarius* est indépendant de l'acide lactique et probablement des AGCC sécrétés dans les surnageants bactériens.



**Figure 4: Effet de l'acide lactique sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules HT-29/kB-luc-E.** Les cellules sont incubées avec les différentes concentrations d'acide lactique (2mM, 3mM, 4mM, 6mM, 8mM, 10mM, 12mM) (barre grise) et le surnageant (Sn) de *S.salivarius* JIM8772 (barre blanche), en présence de TNF $\alpha$  (10ng/ml). Les résultats représentent une des trois expériences indépendantes. p<0.01 (\*\*\*), p>0.05 (ns). Les histogrammes représentent le pourcentage d'activation de la voie NF- $\kappa$ B par rapport à une activation de 100% obtenue par le contrôle.

## **Matériels et méthodes des résultats complémentaires**

### **Gamme d'acide lactique**

A partir d'une solution mère de 1M d'acide lactique ajustée à pH de 5.5, une série de dilutions dans le milieu M17 Glucose est réalisée pour obtenir une gamme de concentrations entre 20 mM et 120 mM. Chaque solution est filtrée sur une membrane de 0,22µm.

### **Culture cellulaire**

Les cellules Caco-2/kB-seap-7 correspondent à un clone de la lignée épithéliale Caco-2 du côlon transfectée d'une manière stable avec un gène rapporteur SEAP (Phosphatase Alcaline Secrétée) pour l'activation NF-κB (Lakhdari et al., 2010). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM (Sigma) supplémenté avec 2mM L-glutamine, 100 IU/ml de pénicilline, 10µg/ml de streptomycine et 20% sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (FCS- Lonza) dans une atmosphère humide 10% CO<sub>2</sub> à 37°C. Les cellules THP-1 bleue<sup>TM</sup> correspondent à des monocytes ont été utilisées comme défini dans le protocole d'instruction d'Invitogen.

### **Analyse de l'activation NF-κB**

Les cellules Caco-2/kB-seap-7 ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits à une hauteur de 50,000 cellules par puits et sont incubées pendant 48h avant l'activation. Les cellules THP-1 bleue<sup>TM</sup> NF-κB/SEAP sontensemencées à une hauteur de 10,000 cellules par puits. Les cellules sont stimulées par 10% vol/vol de surnageants bactériens ou de leurs fractions parallèlement à une stimulation par un activateur de NF-κB (le TNFα, IL-1β ou LPS). Le contrôle utilisé pour chaque expérience est le milieu de culture ajusté au pH 5.5 correspondant au pH des surnageants en fin de culture. La durée d'activation est de 24h.

L'activité SEAP dans le surnageant de culture est révélée par le réactif Quanti-Blue<sup>TM</sup> de Invitrogen comme défini dans le protocole, puis quantifiée par la mesure de DO à 655nm. Les mesures sont réalisées par un lecteur de plaque (Infinite 200, TECAN). Les différents résultats sont exprimés en pourcentage d'activation de la voie NF-κB par rapport au contrôle positif (cellules co-activées avec un activateur NF-κB et le milieu de culture pH 5.5).

## I.2. Article N° 2: Anti-inflammatory properties of *Streptococcus salivarius* a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract

(En préparation pour soumission dans Inflammatory Bowel Diseases)

---

**Ghalia Kaci**<sup>1,2</sup>, Denise Goudercourt<sup>3</sup>, Véronique Dennin, Bruno Pot<sup>3</sup>, J. Doré<sup>1,2</sup>, S. Dusko Ehrlich<sup>1,2</sup>, Pierre Renault<sup>1,2</sup>, Hervé M. Blottière<sup>1,2</sup>, Catherine Daniel<sup>3,4</sup> and Christine Delorme<sup>1,2,4</sup>.

**Objectif :** La bactérie commensale *S. salivarius* joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie épithéliale. Nous avons montré que cette bactérie synthétise et secrète pendant sa croissance un composé actif qui module l'inflammation *in vitro* via l'inhibition de l'activation NF- $\kappa$ B. Le but de ce travail est d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires des bactéries entières (i) *in vitro* dans des modèles cellulaires et (ii) d'analyser *in vivo* sur un modèle d'inflammation digestive les capacités protectrices de la souche la plus active *in vitro*.

**Méthodes :** Des cellules humaines de l'épithélium intestinal (HT-29) ou du sang périphériques (PBMCs) ont été utilisées. Les HT-29 contiennent un système rapporteur à la luciférase pour l'activation de NF- $\kappa$ B. L'effet anti-inflammatoire de *S. salivarius* a été analysé chez des souris présentant une colite (modérée ou sévère) induite au TNBS.

**Résultats :** Contrairement aux bactéries inactivées par la chaleur, les bactéries vivantes répriment la voie NF- $\kappa$ B activée par le TNF $\alpha$  dans les cellules épithéliales HT-29/kB-luc-E. De plus ces bactéries métaboliquement actives diminuent les scores de l'inflammation (score Wallace et Amého) ainsi que l'activité MPO au niveau de la muqueuse colique des souris traitées avec du TNBS.

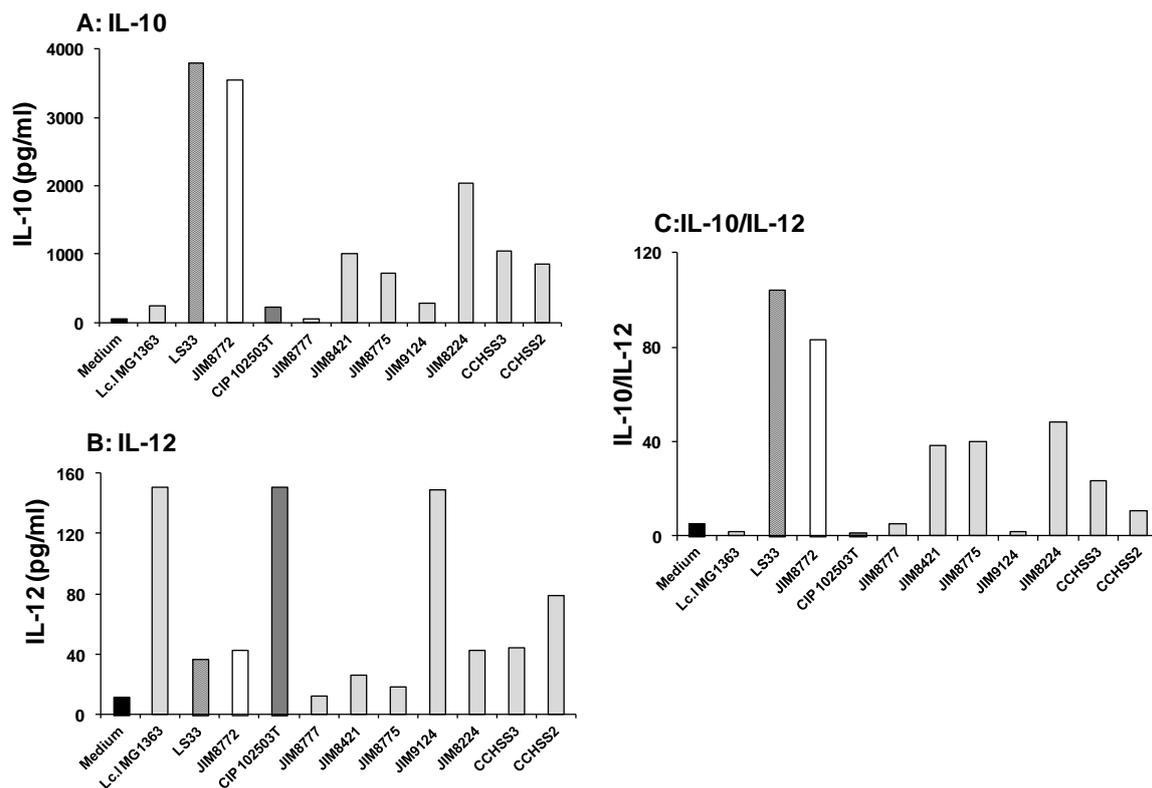
**Conclusion :** *S. salivarius* vivante exerce une activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* bénéfique pour la réponse immunitaire mucoale et le maintien de l'homéostasie intestinale de son hôte.

## Résultats complémentaires de l'article 2

L'utilisation de bactéries commensales comme outil d'immuno-intervention semble être une alternative intéressante dans le traitement des MICI. Cependant les effets bénéfiques de ces bactéries sont spécifiques de la souche utilisée. En fonction des cytokines produites par les cellules immunes (PBMCs), les bactéries présentant des capacités immunomodulatrices sont classées en trois catégories. Des souches qui induisent une forte production d'IL-12 (cytokine pro-inflammatoire) et peu d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire), celles qui au contraire induisent beaucoup d'IL-10 et peu d'IL-12 et celles qui induisent modérément la production de ces deux cytokines (Baba et al., 2008; Foligne et al., 2007b). Une corrélation a été observée entre les profils immunomodulateurs *in vitro* et les effets thérapeutiques des différentes souches dans un modèle murin de colite induit au TNBS. Les souches ayant un ratio IL-10/IL-12 élevé présentent les meilleures capacités anti-inflammatoires *in vivo* (Foligne et al., 2007b). Nos résultats indiquent que les capacités anti-inflammatoires de *S. salivarius* sont spécifiques aux bactéries métaboliquement actives. Nous avons mis en évidence que la répression de la voie NF- $\kappa$ B par ces bactéries est également souches spécifique. Des études complémentaires ont été réalisées afin d'évaluer les propriétés immunomodulatrices de *S. salivarius* sur les cellules PBMCs. Ce travail a pour objectifs (i) d'identifier le profil des cytokines produites par les PBMCs en contact avec *S. salivarius*, (ii) de choisir la souche ayant un ratio IL-10/IL-12 élevé pour étudier ces capacités protectrices *in vivo*. Je présente uniquement les résultats des deux cytokines IL-10 et IL-12 ainsi leur que ratio IL-10/IL-12.

### **La sécrétion des cytokines IL-10 et IL-12 par les PBMCs en présence de *S. salivarius* est souche spécifique**

Pour évaluer les capacités anti-inflammatoires de *S. salivarius*, 9 souches vivantes de cette bactérie ont été mises en contact avec des PBMCs collectées de trois donneurs sains. Le profil de cytokines IL-10 et IL-12 produites dans le milieu en présence des souches de *S. salivarius* a été évalué.



**Figure 1 : Effet des souches de *S. salivarius* sur la production des cytokines IL-10 et IL-12 par les PBMCs humaines.** Les cellules sont incubées pendant 24h avec les souches de *S. salivarius* ou avec les souches de références (Lc.IMG136; pro-inflammatoire et LS33; anti-inflammatoire). Le niveau de cytokines a été analysé dans les surnageants par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). A: cytokine anti-inflammatoire IL-10, B: cytokine pro-inflammatoire IL-12, C: le rapport IL-10/IL-12. Les données exprimées en pg/ml représentent les résultats obtenus avec l'un des trois donneurs distincts de sang.  
 Lc.IMG136: *Lactococcus lactis* Mg1363  
 LS33: *Lactobacillus salivarius* LS33

Comme le montre la **Figure 1**, la sécrétion d'IL-10 et d'IL-12 est très variable pour toutes les souches testées. On observe que les profils de ces deux cytokines sont spécifiques. Les concentrations d'IL-10 varient entre 60 et 4000 pg/ml (**Figure 1A**), alors que celles d'IL-12 sont comprises entre 12-160 pg/ml (**Figure 1B**). La souche JIM8772 présente le plus haut niveau d'IL-10 produit, en atteignant les concentrations obtenues avec la souche anti-inflammatoire *Lactobacillus salivarius* Ls 33. En plus, le ratio IL-10/IL-12 (**Figure 1C**) de cette souche JIM8772 (83) est également le plus élevé et comparable à celui de Ls 33 (104). Ces résultats confirment que les propriétés immunomodulatrices de *S. salivarius* sont souches dépendantes et suggèrent que la souche JIM8772 pourrait potentiellement avoir un effet protecteur contre l'inflammation dans un modèle animal. Cette souche a été sélectionnée pour l'expérimentation animale dans un modèle de colite digestive.

## Matériels et méthodes des résultats complémentaires

### Souches bactériens et conditions de culture

Les souches et leurs origines sont présentées dans le **Tableau 1**. Les souches de *S. salivarius* et *Lactococcus lactis* MG1363 ont été cultivées dans le milieu M17 glucose supplémenté avec 1% glucose à 37 ou 30°C respectivement. La souche de *Lactobacillus salivarius* Ls33 a été cultivée dans le milieu MRS à 37°C, dans des conditions d'anaérobiose (Difco).

Le nombre de bactéries vivantes (CFU) a été déduit par la mesure de la DO des cultures à 600 nm. Pour la stimulation des cellules immunes, les bactéries prélevées en phase stationnaire, ont été lavées et ressuspendues à une concentration de  $10^9$  CFU/ml dans le PBS (phosphate buffered saline) contenant 20% de glycérol. Les suspensions sont conservées à -80°C.

Souches	Identification	Origine
Ls33	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Souche commerciale de Danisco
MG1363	<i>Lactococcus lactis</i>	Cheese starter (Gasson, 1983)
JIM8772	<i>Streptococcus salivarius</i>	Cavité buccale humaine
CIP102503T	<i>Streptococcus salivarius</i>	Sang humain
JIM8777	<i>Streptococcus salivarius</i>	Cavité buccale humaine
JIM8421	<i>Streptococcus salivarius</i>	Lait maternel humain
JIM8775	<i>Streptococcus salivarius</i>	Cavité buccale humaine
JIM9124	<i>Streptococcus salivarius</i> K12	Cavité buccale humaine (Tagg and
JIM8224	<i>Streptococcus salivarius</i>	Dierksen, 2003)
CCHSS3	<i>Streptococcus salivarius</i>	Cavité buccale humaine
CCHSS2	<i>Streptococcus salivarius</i>	Sang humain
		Sang humain

### Isolation des PBMCs

Les PBMCs ont été isolées du sang périphérique de donneurs sains comme décrit par Foligné (Foligne et al., 2007b). Brièvement, après un gradient de centrifugation Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden), les cellules mononucléaires sont collectées, lavées avec le milieu RPMI 1640 (Live technologies, Paisley, Scotland) et ajustées à  $2 \times 10^6$  cellules/ml dans le milieu RPMI 1640 supplémenté avec gentamicine (150 mg/ml), L-glutamine (2 mM), et 10% de sérum de veau fœtal (FCS- Gibco-BRL).

## **Induction de la sécrétion des cytokines**

Les PBMC ( $2 \times 10^6$  cellules/ml) sontensemencées dans une plaque de culture cellulaire de 24 puits (Corning, NY). 20µl de la suspension bactérienne à  $10^9$  CFU/ml préparée dans le PBS contenant 20% de glycérol sont rajoutés (ratio bactérie : cellule de 10 :1). La solution PBS avec 20% de glycérol est utilisée comme contrôle. Après 24 h de stimulation dans une atmosphère humide 5% CO<sub>2</sub> à 37°C, les surnageants sont collectés, filtrés par centrifugation puis congelés à -20 °C pour l'analyse des cytokines. Ni l'acidification du milieu ni la prolifération bactérienne ou fongique n'ont été observées.

## **Dosage des cytokines**

Les différentes cytokines ont été mesurées par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Les paires d'anticorps (BD Biosciences, San Jose, Ca, USA) pour détecter interleukine IL-10 et IL-12p70 sont utilisés selon le protocole recommandé par le fabricant.

**Anti-inflammatory properties of *Streptococcus salivarius* a commensal  
bacterium of the oral cavity and digestive tract**

Ghalia Kaci<sup>1,2</sup>, Denise Goudercourt<sup>3</sup>, Véronique Dennin, Bruno Pot<sup>3</sup>, J. Doré<sup>1,2</sup>,  
S. Dusko Ehrlich<sup>1,2</sup>, Pierre Renault<sup>1,2</sup>, Hervé M. Blottière<sup>1,2</sup>, Catherine Daniel<sup>3,4</sup>  
and Christine Delorme<sup>1,2,4</sup>.

**1** INRA, UMR1319 Micalis, F-78352 Jouy-en-Josas, France, **2** AgroParisTech, UMR Micalis, F-78352 Jouy-en-Josas, France, **3** Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, Université Lille Nord de France, CNRS, UMR 8204, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019 Lille, France.

**4** Authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to CD ([christine.delorme@jouy.inra.fr](mailto:christine.delorme@jouy.inra.fr)).

## Abstract

*Streptococcus salivarius* is one of the first colonizers of human oral cavity and gut after birth, and may therefore contribute to the establishment of immune homeostasis and regulation of host inflammatory responses. The anti-inflammatory effects of two *S. salivarius* strains was first evaluated *in vitro* on intestinal epithelial cells (IECs) and *in vivo* in a mouse model of acute experimental colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid [TNBS] after oral administration. Both *S. salivarius* strains downregulated NF- $\kappa$ B activation (by 50% and 80%) in the reporter HT-29 cells induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Moreover, the *S. salivarius* strain giving the best results *in vitro* significantly prevented TNBS-induced colitis in contrast to the untreated control mice or mice treated with dead bacteria. The anti-inflammatory effects exhibited by the commensal *S. salivarius* strain on both IECs and in mouse colitis models required viable bacteria.

## Introduction

Under physiological conditions, the commensal intestinal bacteria induce tolerant responses and trigger the maintenance of immune homeostasis (Artis, 2008). Altered immune response is one of the elements related to the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) and mounting evidence indicates that the NF- $\kappa$ B signaling pathway plays a major role in inflammatory responses making this pathway a potential target in therapy (Yoon and Sun). Some strains belonging to the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species have been shown to reduce inflammatory responses including NF- $\kappa$ B activation and IL-8 production in various models of intestinal epithelial cells (Candela et al., 2008; Lin et al., 2009; Tien et al., 2006). NF- $\kappa$ B is a dimeric transcription factor whose activation is connected to several receptors including Toll-Like Receptors (TLRs). Initially sequestered in the cytoplasm by I $\kappa$ B protein (an NF- $\kappa$ B inhibitor), NF- $\kappa$ B is released following phosphorylation, poly-ubiquitination and degradation of I $\kappa$ B, respectively by IKK (Inhibitor of  $\kappa$ B kinase) and the proteasome complex, upon activation of the signaling cascade. Free NF- $\kappa$ B then translocates into the nucleus where it plays the role of transcriptional regulator of genes involved in the inflammatory process, such as the gene encoding interleukin-8 (IL-8) (Wan and Lenardo). The NF- $\kappa$ B signaling pathway is constitutively activated in chronic inflammatory conditions and its different steps represent potential targets for anti-inflammatory bacteria to inhibit NF- $\kappa$ B activation. Indeed, the *Lactobacillus casei* DN-114 001 strain was shown to modulate pro-inflammatory pathways on *Shigella*-infected human IECs. Genes involved in ubiquitination and proteasome processes appeared to be the targets of *L. casei* anti-inflammatory effects (Tien et al., 2006). Similarly, the anti-inflammatory effect of non-pathogenic *Salmonella* strains involved inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway through interference with I $\kappa$ B $\alpha$  degradation (Kumar et al., 2007; Neish et al., 2000). Moreover, the probiotic mixture VSL#3 (composed

of one strain of *Streptococcus thermophilus*, four strains of *Lactobacillus* and three strains of *Bifidobacteria*), a *Lactobacillus reuteri* and a *Saccharomyces boulardii* strain also prevent the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ , resulting in the sequestration of NF- $\kappa$ B in the cytoplasm (Ma et al., 2004; Petrof et al., 2004b; Sougioultzis et al., 2006). Recently, Heuvelin *et al.* showed that a soluble factor from the *Bifidobacterium breve* C50 strain inhibits the release of inflammatory cytokines by interfering with the cellular phosphorylation step of the NF- $\kappa$ B pathway (Heuvelin et al., 2009). Finally, the nuclear export of the NF- $\kappa$ B subunit RelA was also described as a target of the anti-inflammatory properties of *Bacteroides thetaiotamicron* (Kelly et al., 2004). Several NF- $\kappa$ B or cytokines modulation capacities of commensal species from the intestinal microbiota established *in vitro* on IECs are correlated with anti-inflammatory effects *in vivo*. Daily oral administration of strains, the most commonly used belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, have been shown to attenuate inflammation in TNBS or DSS-treated mice (Daniel et al., 2006; Foligne et al., 2007b; Heuvelin et al., 2009; Kim et al., ; Zoumpopoulou et al., 2008). Strains able to inhibit the intestinal inflammation in experimental mouse colitis models would likely be good candidates to be used as probiotics against intestinal inflammation but till now, a small number of human trials have shown promise for probiotic use in the prevention or treatment of inflammatory bowel diseases (IBD) (Rauch and Lynch). Nevertheless, favorable effects on irritable bowel syndrome (IBS), remission in treated patients with mild to moderate ulcerative colitis (UC) or with recurrent and mildly active pouchitis, have been observed with the VSL#3 probiotic mixture (Bibiloni et al., 2005; Gionchetti et al., 2007; Mimura et al., 2004). Positive outcomes of chronic intestinal inflammation or diarrheal disease were described in clinical trials with the Gram-negative *Escherichia coli* Nissle 1917, the *L. reuteri* SD2112 strain, the *L. rhamnosus* GG, as well as a yeast probiotic *Saccharomyces boulardii* strain (Petrof, 2009).

The bacterium *S. salivarius* establishes in the human oral cavity within a few hours after birth and remains a predominant commensal inhabitant. It is but is also detected in the digestive tract from gastric biopsies of stomach and jejunum (Hakalehto et al., 2011b; Wang et al., 2005). These findings show that this bacterium has an important role in oral ecology and also in the digestive tract. Indeed, several *S. salivarius* strains isolated from the human pharynx are able to inhibit the growth of respiratory pathogens. The *S. salivarius* TOVE-R strain has been reported as a successful antagonist strain of virulent streptococci involved in tooth decay or pharyngitis such as *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus pyogenes* (Tanzer et al., 1985), and pathogens involved in periodontitis (Sliepen et al., 2009b; Van Hoogmoed et al., 2008). The inhibitory activity towards *S. pyogenes* or *S. pneumoniae* was attributed to bacteriocin production (Birri et al., 2012; Santagati et al., 2012b; Tagg and Dierksen, 2003). In addition to its antimicrobial activity, *S. salivarius* is able to affect immune responses by inhibition of inflammatory pathways induced by pathogens suggesting a role in modulating human epithelial cell immune responses. This strain has also been shown to influence the inflammatory responses triggered by periodontopathogens and enteric pathogens in epithelial cells (Frick et al., 2007a; Sliepen et al., 2009a). Similarly, the *S. salivarius* strain K12 was also able to affect IL-8 secretion and innate immune response pathways in bronchial and pharyngeal epithelial cells suggesting a role in the human nasopharynx immune responses (Cosseau et al., 2008; Guglielmetti et al.). *S. salivarius* could be useful in the prevention or treatment of oral diseases and in some countries such as New Zealand the K12 strain has been used for several years as an oral probiotic to prevent colonization by *S. pyogenes* and *Candida albicans* in oral candidiasis (Ishijima et al., ; Tagg and Dierksen, 2003).

Until now, the potential of this bacterium has not been investigated in the intestinal tract especially in strategies to prevent or treat inflammatory dysfunction such as IBS or IBD.

Recently, we have demonstrated that culture supernatants from various *S. salivarius* strains have regulatory effects on the NF- $\kappa$ B pathway in human intestinal epithelial cells. We were able to show the presence of a low molecular weight active metabolite in *S. salivarius* supernatant that harbored anti-inflammatory properties *in vitro* on IECs as well as immune cells, through inhibition of NF- $\kappa$ B activation (Kaci et al., 2011b). In the present study, we investigated the immunomodulatory properties of two live commensal *S. salivarius* strains by *in vitro* measurements of NF- $\kappa$ B activation using luciferase reporter systems expressed in HT-29 human IECs. We then evaluated the protective capacities of the strain giving the best results *in vitro* in a TNBS mouse colitis model.

## **Material and Methods**

### **Cell culture**

HT-29 cells were grown in RPMI (Sigma) supplemented with 2mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS - Lonza) in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Caco-2 were cultured in DMEM (Sigma) supplemented with the same amounts of glutamine and antibiotics, 20 % heat-inactivated FCS and 1x non-essential amino acids (Invitrogen). The THP-1 blue™ CD14+ NF-κB/SEAP reporter cells were obtained from Invitrogen and used according to the manufacturer's instruction.

### **Preparation of bacterial suspension from *S. salivarius***

The JIM8772 and CIP102503T *S. salivarius* strains used in this work were previously described (Kaci et al., 2011b). Bacteria were grown 6 hours on M17 or on CDM (chemically defined medium) supplemented with glucose (0.5g/l) at 37°C (Kaci et al., 2011b). Bacterial suspension corresponding to *S. salivarius* cultured in M17, were collected by centrifugation (5000xg, 5 minutes), washed, resuspended in fresh medium at a concentration of 10<sup>8</sup> or 10<sup>9</sup> colony-forming units (CFU)/ml. Heat-killed bacteria were prepared by heating bacterial suspension at 65°C for 20 minutes. Bacteria were confirmed to be nonviable after plating on M17 agar and fluorescent staining of cells with FM4-64 membrane dye at 0.5 µg/ml (Invitrogen). Culture supernatants were prepared as described previously (Kaci et al., 2011b).

### **Analyses of NF-κB activation**

For each experiment, HT-29/kB-luc-E reporter cells were seeded at 50,000 cells per well, into 96-wells plates and incubated 48 hours before stimulation. Cells were stimulated with a NF-κB activator (TNF-α), together with 10% vol/vol tested *S. salivarius* bacterial suspensions at a MOI of 40 bacteria per cell. In control assays, cells were incubated with control media consisting of bacteria culture medium (M17 or CDM) adjusted to the pH (~5.5) corresponding

to that of the supernatants at the end of the culture. Stimulation length was 6 hours for HT-29/ $\kappa$ B-luc-E.

Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System (Promega) according to manufacturer's instructions and quantified as relative luminescence units (RLU). SEAP in the culture supernatant was revealed using Quanti-Blue<sup>TM</sup> reagent (Invivogen) using the manufacturer's protocol and quantified as OD at 655nm. All measurements were performed using a microplate reader (Infinite 200, Tecan). Results are expressed as relative percentage of NF- $\kappa$ B activation compared to positive control i.e. cells stimulated with growth medium plus the NF- $\kappa$ B activator. Cell viability was checked using the CellTiter 96 Aqueous One solution (Promega) according to manufacturer's protocol.

### **Mice**

Seven-week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France). Experiments were performed in an accredited establishment (no. A59107; Institut Pasteur de Lille) according to European guidelines (number 86/609/CEE), and animal protocols were approved by the local ethics committee.

### **Induction of colitis and inflammation scoring**

Groups of 12 mice were given either carbonate buffer (control mice),  $5 \cdot 10^8$  live or heat-killed *S. salivarius* JIM8772 daily for 5 consecutive days via the intragastric route. Acute colitis was triggered as described previously on day 5 by intrarectal administration of a 50- $\mu$ L solution of TNBS (Sigma-Aldrich) in 50% ethanol (Foligne et al., 2006) 100 mg/kg and 120 mg/kg were used to induce a moderate and a strong colitis, respectively (Foligne et al., 2006). Three days after induction of colitis, mice were killed; blood samples were immediately taken and stored in heparinized tubes. After mouse dissection, 2 independent observers blindly scored the macroscopic inflammation of the colon on the Wallace scale. Two-centimeter-long fragments of the distal colon were collected and frozen at -80°C for histologic analysis; paraffin-

embedded 5- $\mu\text{m}$  sections stained with May–Grünwald–Giemsa were examined under the microscope, and tissue lesions were scored according to the Ameho criteria. Additionally, the degree of polymorphonuclear neutrophil infiltration in the distal colon was assessed by quantifying myeloperoxidase (a granule enzyme), as reported previously.

### **Statistical analysis**

In *in vitro* analyses, results are means  $\pm$  standard deviation of triplicate measurements from one representative experiment out of a minimum of 3 independent performed. Data were analyzed by Student's *t* test. The *p* values were considered significant when  $<0.05$ .

In *in vivo* analyses, Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann–Whitney *U* test. Differences were considered to be statistically significant when the *P* value was  $<0.05$ .

## Results

### **Effect of *S. salivarius* on NF- $\kappa$ B activation induced by TNF- $\alpha$ in HT-29/kB-luc-E reporter cells.**

A recent study showed that live *S. salivarius* K12 is involved in modulation of inflammatory response genes (Cosseau et al., 2008). In order to determine whether this property was restricted to a particular strain we tested NF- $\kappa$ B activation in HT-29/kB-luc-E reporter cells stimulated by the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in the presence of live, heat-killed, or supernatant of *S. salivarius* JIM8772 and CIP102503T. The results are presented in Figure 1. As described in Kaci *et al.* (Kaci et al., 2011b), the supernatant of these two *S. salivarius* strains markedly inhibited TNF- $\alpha$ -stimulated NF- $\kappa$ B activation (by approximately 40%). Similarly, both live *S. salivarius* bacteria significantly inhibited NF- $\kappa$ B activation (by 50 % and 80%) while heat-killed bacteria did not.

### **Protection of *S. salivarius* in moderate colitis in TNBS-treated mice.**

We then investigated the ability of the *S. salivarius* JIM8772 strain, giving the best results *in vitro*, to prevent acute TNBS-induced colitis in BALB/c mice (Figures 2, and 3). In a moderate colitis, intrarectal instillation of TNBS triggered inflammation of the distal colon (Figure 2A) and weight loss (data not shown). Moreover, as shown in Figure 3A, the myeloperoxidase (MPO) levels in the colonic tissues of TNBS-treated mice were elevated and reflect the levels of neutrophil recruitment. In contrast, daily intragastric administration of live *S. salivarius* JIM8772 for 5 consecutive days before TNBS administration resulted in a significant reduction of the inflammatory score (Fig. 2A) and MPO level (Fig. 3A). However, no significant reduction of weight loss was observed in comparison to the TNBS control group (data not shown). Moreover, no significant improvement of colitis (Wallace score) and no reduction in tissue MPO was observed in the groups fed with heat-killed bacteria instead of living bacteria (Fig. 2 and 3).

***S. salivarius* also reduces severe colitis in TNBS-treated mice.**

We then examined damage reduction effect of *S. salivarius* JIM8772 in a more severe colitis. The intrarectal instillation of TNBS triggered a more intense inflammation associated with a mean Wallace score of 6 of the distal colon (Fig. 2) Daily intragastric administration of live *S. salivarius* JIM8772 in TNBS-treated mice still resulted in a significant reduction of the inflammatory score (Fig. 2), with decreased loss of goblet cells and crypts and a reduction in inflammatory infiltrates (mainly neutrophils) and colon wall thickness. Indeed, we have also shown significant histologic improvements and reductions in tissue myeloperoxidase activity in comparison with the TNBS-treated mice (Figure 3 and 4). However, no significant reduction of weight loss (data not shown) was observed. Lastly, no significant improvement of colitis and no reduction in tissue MPO were observed in the groups fed with heat-killed bacteria

## Discussion

There is an increase in the number of investigations on the role of microbiota in human health and disease. Dysbiosis in gut microbiota plays an important role in promoting and maintaining inflammation in IBD and some probiotics that provide beneficial effects on inflammation are isolated from our intestinal microflora. In this study, we have shown that a *S. salivarius* strain isolated from the oral cavity is able to prevent the inflammatory response *in vitro* and also *in vivo*. We showed that two live *S. salivarius* strains as well as their culture supernatants inhibited the activation of NF- $\kappa$ B. Our data also demonstrate that out of these two strains, the strain JIM8772 giving the best results *in vitro*, significantly inhibits inflammation in a moderate and a severe colitis mouse model. It is noteworthy, that the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of the live strain are not reproduced, with the heat-killed bacteria, suggesting a protective response exclusively with metabolically active bacteria.

Over the past few years, probiotics belonging to different species have been investigated in the prevention of inflammation and their beneficial effects on the host have been shown to be triggered by different mechanisms of action. In spite of the fact that some beneficial effects on the protection of epithelial cells against damage have been shown to require contact and living bacteria, differential immune responses toward dead bacteria were described. Some studies have shown that dead bacteria may be as effective to ameliorate inflammation as live bacteria. Dead *Lactobacillus rhamnosus* have been shown to be sufficient to have an immunomodulating effect against pathogens infection in mice (Lin et al., 2007). Moreover, heat-killed *Lactobacillus acidophilus* GG decrease IL-8 secretion in Caco2 cells and LPS-induced proinflammatory mediators in mice with the same potential as live bacteria (Zhang et al., 2005, Li, 2009 #29). We can hypothesize that the active components in heat-killed bacteria could be cell surface components such as the cell wall, lipoteichoic acid

and peptidoglycane. In contrast, anti-inflammatory effects found exclusively with living bacteria and their culture supernatant could be mediated by the secretion of an active compound by the bacteria. We have recently reported that the anti-inflammatory properties of *S. salivarius* JIM8772 and CIP102503T strains do not require the direct interaction of bacteria with epithelial cells suggesting that both *S. salivarius* strains are able to release a low-molecular-weight soluble factor(s) that significantly reduces the activation of NF- $\kappa$ B and IL-8 secretion in several lines of intestinal epithelial and immune cells (Kaci et al., 2011b).

These findings confirm that *S. salivarius* strains are involved in the molecular cross-talk between microbiota and host with beneficial potential on host mucosal immune responses exerted through anti-inflammatory effects. Moreover, the anti-inflammatory properties of several other *S. salivarius* strains such as TOVE, PZ86 and K12 strains have been recently highlighted *in vitro* in several cell models triggered by different inflammatory mediators. On cell lines from gingival and intestinal mucosa, various *S. salivarius* strains led to a reduction of both NF- $\kappa$ B activation and IL-8 production triggered by pathogens such as *Yersinia enterocolitica* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Frick et al., 2007a; Sliepen et al., 2009a). Similarly, on bronchial and pharyngeal epithelial cells, *S. salivarius* K12 was shown to inhibit NF- $\kappa$ B activation and IL-8 secretion elicited by *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* flagellin or IL1- $\beta$  (Cosseau et al., 2008; Guglielmetti et al.). In addition, a specific modulation of gene expression involved in innate immune responses, homeostasis and general epithelial cell function was described in response to *S. salivarius* K12 stimulation (Cosseau et al., 2008). We have shown for the first time that *S. salivarius*, a human commensal of the oral cavity and nasopharynx, can induce tolerance and anti-inflammatory effects in the gut where it is sub-dominant.

In the salivarius group, *S. thermophilus*, a dairy bacteria phylogenetically closely related to *S. salivarius* is also described as a probiotic conferring gastrointestinal epithelium protection and intestinal barrier reinforcement (Menard et al., 2005; Resta-Lenert and Barrett, 2003). Recently, treatment with the live *S. thermophilus* TH-4 strain as well as their culture supernatant partially attenuated damages on intestinal mucositis (Tooley et al., 2006; Whitford et al., 2009). Nevertheless, preventive effects of the live TH-4 strain on intestinal mucositis and its therapeutic potential against colorectal carcinoma seem to be controversial (Tooley et al., 2011). *S. thermophilus* is also used in association with other probiotic strains in different mixtures (such as the VSL#3 mixture) that were shown to prevent inflammation against chronic inflammatory bowel disease (Petrof, 2009; Roselli et al., 2009). It is worth noting that the VSL#3 mixture promotes gut health through both anti-inflammatory effects and stimulation of host immune responses. VSL#3 secreted products were also shown to inhibit degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B by blocking proteasome activity in murine gut epithelial cells *in vitro* (Petrof et al., 2004b). Oral administration of a high-dose of VSL#3 is able to prevent inflammation coupled with stimulation of TNF- $\alpha$  synthesis in intestinal epithelial cells. This pretreatment prevents the onset of ileitis through activation of the NF- $\kappa$ B pathway by a mechanism which involves stimulation of immune responses rather than inhibition of inflammation (Pagnini et al.). Although in the literature probiotic-induced effects are generally attributed to an inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway ((Kumar et al., 2007; Ma et al., 2004; Neish et al., 2000; Petrof et al., 2004b; Sougioultzis et al., 2006; Tien et al., 2006; Zhang et al., 2005), this concept has been revisited by Pagnini *et al.* who supports the hypothesis that probiotics promote gut health through local stimulation of epithelial innate immune response rather than suppression (Pagnini et al., 2010).

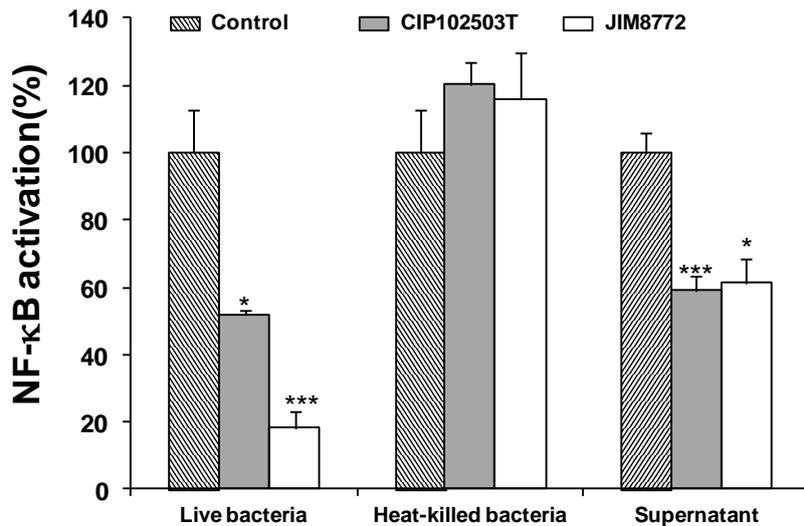
Despite the fact that the therapeutic strategy using live probiotics is not without any risk for certain populations such as sick patients or very young individuals, some probiotics have now

been associated with sound clinical benefits (Petrof, 2009). The *S. salivarius* bacteriocin-producing K12 strain has been used as an oral probiotic against streptococcal pharyngitis and halitosis for many years in New Zealand. (Tagg and Dierksen, 2003). Fourteen days after the initiation of the colonization trial with *S. salivarius* K12, the amount of bacteria detected in 16 different oral sites is negligible suggesting a short-term colonization of the oropharyngeal mucosa after oral administration (Horz et al., 2007). Recently, in controlled human volunteers studies, the tolerance and proliferation of this strain have been followed in 53 subjects actively ingesting or not *S. salivarius* K12 (Burton et al., 2011a). The safety and tolerability of the daily ingestion of *S. salivarius* K12 supported by clinical studies and the absence of proliferation are encouraging demonstrations of the potential of *S. salivarius* in human therapy.

In summary, the present study outlines the anti-inflammatory properties of commensal *S. salivarius* strains and provides evidence that *S. salivarius* can attenuate *in vivo* inflammation in an experimental mouse colitis model supporting its potential use as a probiotic. Our study also showed that viability of bacteria is an essential factor in these anti-inflammatory properties. The exact nature and the mechanism of action of the active product(s) from *S. salivarius* as well as their implications in human health remain to be characterized.

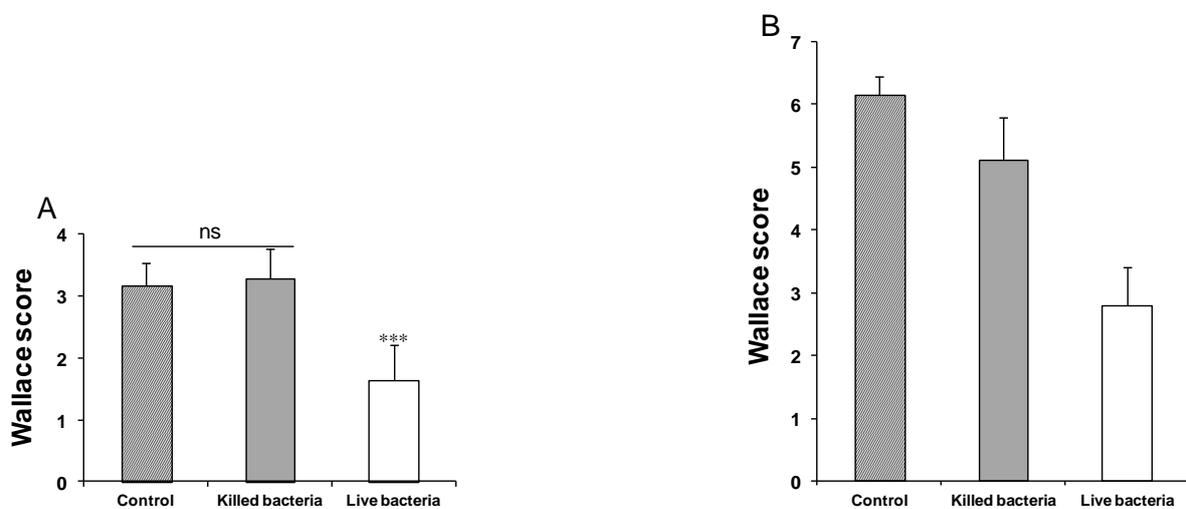
### **Acknowledgements**

We thank Sabine Poiret for her assistance in strain preparation and animal experiments. This work was supported by Institut National de la Recherche Agronomique and by the EU MetaHit (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) project HEALTH-F4-2007-201052. This work was also supported by Institut Pasteur de Lille.



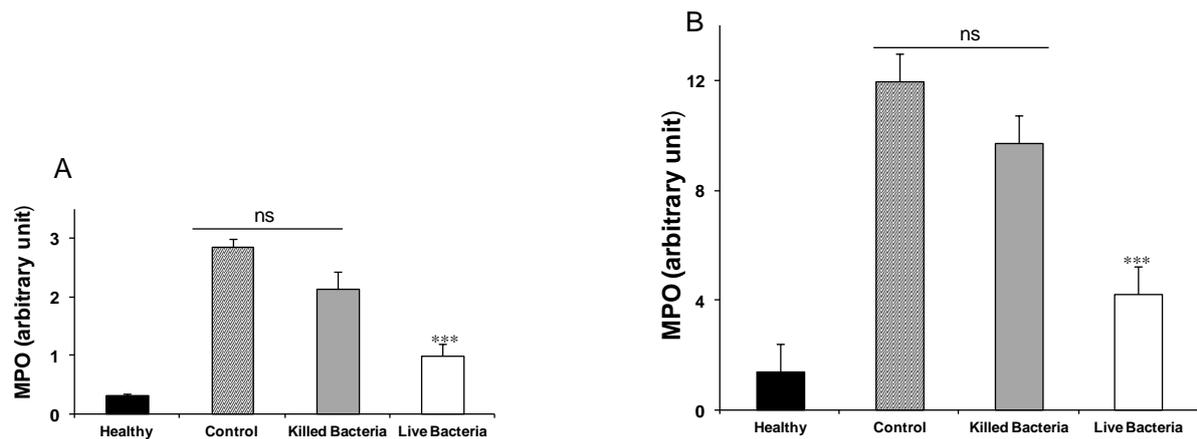
**Figure 1: Effects of live *S. salivarius* on HT-29/kB-luc-E cells**

HT-29 reporter cells were incubated with live, heat-killed or supernatants from CIP102503T and JIM8772 *S. salivarius* strains (MOI 1:40), in presence or absence of TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). Results are from one representative out of 3 independent experiments.  $p < 0.05$  as compared to control consisting of cells incubated with culture medium for all tested strains.



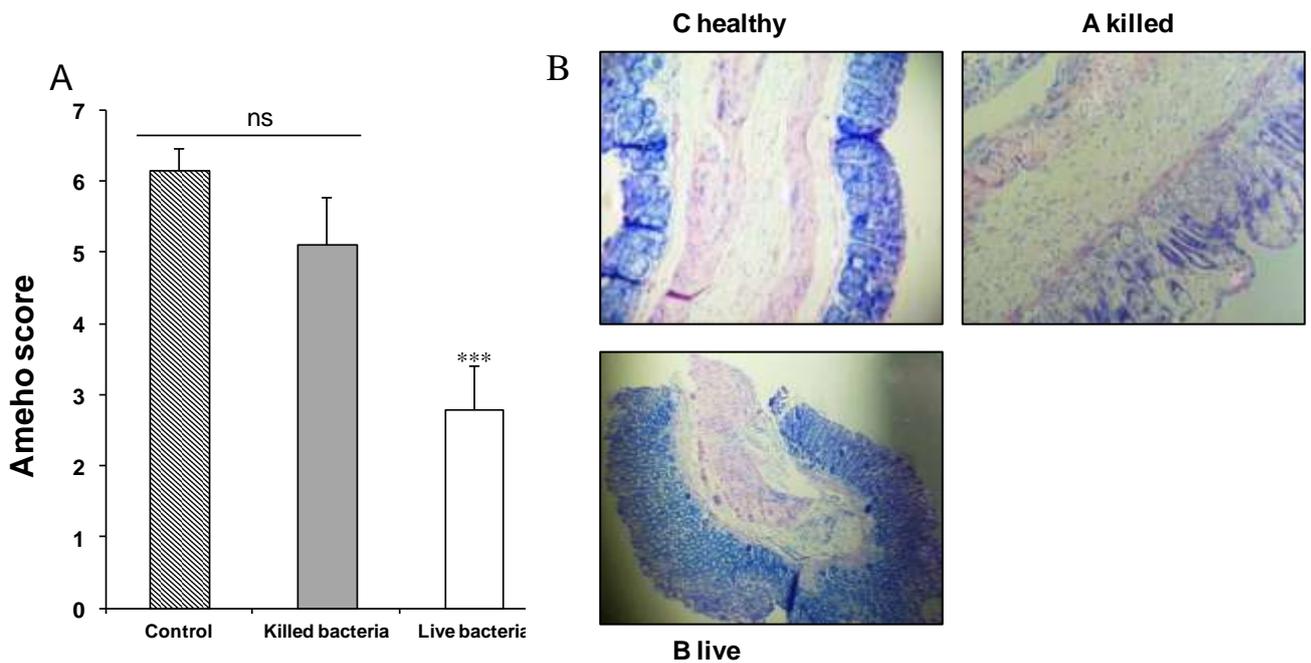
**Figure 2: Protective effects of live *S. salivarius* against TNBS-induced colitis on colonic macroscopic damage (Wallace score).**

BALB/c mice were fed for 5 days with carbonate buffer (control) or  $5.10^8$  CFU of *S. salivarius*: JIM8772 (live or killed), and acute colitis was induced with an intra-rectal administration of TNBS. Wallace scores were used to quantify macroscopic colitis activity in colon of mice 72h after induction of colitis. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control (TNBS only). A: moderate colitis; B: severe colitis.



**Figure 3: Live *S. salivarius* decrease the infiltration of polymorphonuclear neutrophil in the distal colon of mice with TNBS-induced colitis.**

Polymorphonuclear neutrophil infiltration was measured in the distal colon by quantification of the myeloperoxidase (MPO) activity 3 days after induction of colitis. Mice were fed with PBS (control) or  $5.10^8$  CFU of *S. salivarius* (live or killed) 5 days before intrarectal administration of TNBS. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control (TNBS only). Myeloperoxidase from human polymorphonuclear neutrophils was used for calibration; one enzyme unit degrades 1  $\mu\text{mol}$  hydrogen peroxide/min/mL at 25°C. A: moderate colitis; B: severe colitis.



**Figure 4: Protective effects of live *S. salivarius* on severe colitis:** Ameho scores (A) illustrated with representative sections of the distal colon of healthy mice or mice with TNBS-induced colitis, treated by a daily intragastric administration of PBS or  $5 \times 10^8$  CFU of *S. salivarius*: JIM8772 (live or killed). Data represent mean values with the SEM (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs PBS-treated mice). Histologic features (B) of *S. salivarius*-mediated protection. The figure shows representative May–Grünwald–Giemsa–stained colon sections on day 3 after instillation of TNBS in BALB/c mice pretreated with heat-killed *S. salivarius* strains (b) live strains (c) as compared healthy mice (a) not given TNBS (original magnification 40x). (b) corresponds to an Ameho score of 7, showing transmural inflammation and important thickening of the colon wall, characterized by prominent inflammatory infiltrates of mononuclear cells (mainly neutrophils) in the lamina propria, extensive ulceration, and focal epithelial necrosis extending into the muscle layers, in addition to massive goblet cell depletion. (c) yields a score of 2, with only slight thickening of the submucosa, mild, localized submucosal inflammatory infiltrates, moderate superficial erosions, and the presence of a few crypts with minor hyperplasia, resulting in a well-conserved mucosal architecture more similar to the normal appearance of healthy mice colons (a).

## References

1. Artis, D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8:411-20.
2. Bibiloni, R., R. N. Fedorak, G. W. Tannock, K. L. Madsen, P. Gionchetti, M. Campieri, C. De Simone, and R. B. Sartor. 2005. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 100:1539-46.
3. Birri, D. J., D. A. Brede, and I. F. Nes. 2012. Salivaricin D, a novel intrinsically trypsin-resistant lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c isolated from a healthy infant. *Appl Environ Microbiol* 78:402-10.
4. Burton, J. P., S. Cowley, R. R. Simon, J. McKinney, P. A. Wescombe, and J. R. Tagg. 2011. Evaluation of safety and human tolerance of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Food Chem Toxicol* 49:2356-64.
5. Candela, M., F. Perna, P. Carnevali, B. Vitali, R. Ciati, P. Gionchetti, F. Rizzello, M. Campieri, and P. Brigidi. 2008. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol* 125:286-92.
6. Cosseau, C., D. A. Devine, E. Dullaghan, J. L. Gardy, A. Chikatamarla, S. Gellatly, L. L. Yu, J. Pistolic, R. Falsafi, J. Tagg, and R. E. Hancock. 2008. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun* 76:4163-75.
7. Daniel, C., S. Poiret, D. Goudercourt, V. Dennin, G. Leyer, and B. Pot. 2006. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Appl Environ Microbiol* 72:5799-805.
8. Foligne, B., S. Nutten, C. Grangette, V. Dennin, D. Goudercourt, S. Poiret, J. Dewulf, D. Brassart, A. Mercenier, and B. Pot. 2007. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 13:236-43.
9. Foligne, 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* 51:390-400.
10. Frick, J. S., K. Fink, F. Kahl, M. J. Niemiec, M. Quitadamo, K. Schenk, and I. B. Autenrieth. 2007. Identification of commensal bacterial strains that modulate *Yersinia enterocolitica* and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: implications for the development of probiotics. *Infect Immun* 75:3490-7.
11. Gionchetti, P., F. Rizzello, C. Morselli, G. Poggioli, R. Tambasco, C. Calabrese, P. Brigidi, B. Vitali, G. Straforini, and M. Campieri. 2007. High-dose probiotics for the treatment of active pouchitis. *Dis Colon Rectum* 50:2075-82; discussion 2082-4.
12. Guglielmetti, S., V. Taverniti, M. Minuzzo, S. Arioli, M. Stuknyte, M. Karp, and D. Mora. 2010. Oral bacteria as potential probiotics for the pharyngeal mucosa. *Appl Environ Microbiol* 76:3948-58.
13. Hakalehto, E., T. Vilpponen-Salmela, K. Kinnunen, and A. von Wright. 2011. Lactic Acid bacteria enriched from human gastric biopsies. *ISRN Gastroenterol* 2011:109183.

14. Heuvelin, E., C. Lebreton, C. Grangette, B. Pot, N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman. 2009. Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by bifidobacterium breve soluble factors. *PLoS One* 4:e5184.
15. Horz, H. P., A. Meinelt, B. Houben, and G. Conrads. 2007. Distribution and persistence of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in the human oral cavity as determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 22:126-30.
16. Ishijima, S. A., K. Hayama, J. P. Burton, G. Reid, M. Okada, Y. Matsushita, and S. Abe. 2012. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. *Appl Environ Microbiol* 78:2190-9.
17. Kaci, G., O. Lakhdari, J. Dore, S. D. Ehrlich, P. Renault, H. M. Blottiere, and C. Delorme. 2011. Inhibition of the NF-kappaB pathway in human intestinal epithelial cells by commensal *Streptococcus salivarius*. *Appl Environ Microbiol* 77:4681-4.
18. Kelly, D., J. I. Campbell, T. P. King, G. Grant, E. A. Jansson, A. G. Coutts, S. Pettersson, and S. Conway. 2004. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 5:104-12.
19. Kim, S. W., H. M. Kim, K. M. Yang, S. A. Kim, S. K. Kim, M. J. An, J. J. Park, S. K. Lee, T. I. Kim, W. H. Kim, and J. H. Cheon. 2010. *Bifidobacterium lactis* inhibits NF-kappaB in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Inflamm Bowel Dis* 16:1514-25.
20. Kumar, A., H. Wu, L. S. Collier-Hyams, J. M. Hansen, T. Li, K. Yamoah, Z. Q. Pan, D. P. Jones, and A. S. Neish. 2007. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *Embo J* 26:4457-66.
21. Lin, P. W., L. E. Myers, L. Ray, S. C. Song, T. R. Nasr, A. J. Berardinelli, K. Kundu, N. Murthy, J. M. Hansen, and A. S. Neish. 2009. *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 47:1205-11.
22. Lin, W. H., B. Yu, C. K. Lin, W. Z. Hwang, and H. Y. Tsen. 2007. Immune effect of heat-killed multistrain of *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella typhimurium* invasion to mice. *J Appl Microbiol* 102:22-31.
23. Ma, D., P. Forsythe, and J. Bienenstock. 2004. Live *Lactobacillus rhamnosus* [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun* 72:5308-14.
24. Menard, S., D. Laharie, C. Asensio, T. Vidal-Martinez, C. Candalh, A. Rullier, F. Zerbib, F. Megraud, T. Matysiak-Budnik, and M. Heyman. 2005. *Bifidobacterium breve* and *Streptococcus thermophilus* secretion products enhance T helper 1 immune response and intestinal barrier in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:749-56.
25. Mimura, T., F. Rizzello, U. Helwig, G. Poggioli, S. Schreiber, I. C. Talbot, R. J. Nicholls, P. Gionchetti, M. Campieri, and M. A. Kamm. 2004. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 53:108-14.
26. Neish, A. S., A. T. Gewirtz, H. Zeng, A. N. Young, M. E. Hobert, V. Karmali, A. S. Rao, and J. L. Madara. 2000. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 289:1560-3.

27. Pagnini, C., R. Saeed, G. Bamias, K. O. Arseneau, T. T. Pizarro, and F. Cominelli. 2010. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:454-9.
28. Petrof, E. O. 2009. Probiotics and Gastrointestinal Disease: Clinical Evidence and Basic Science. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 8:260-269.
29. Petrof, E. O., K. Kojima, M. J. Ropeleski, M. W. Musch, Y. Tao, C. De Simone, and E. B. Chang. 2004. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 127:1474-87.
30. Rauch, M., and S. Lynch. 2012. The potential for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. *Curr Opin Biotechnol* 23:192-201.
31. Resta-Lenert, S., and K. E. Barrett. 2003. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52:988-97.
32. Roselli, M., A. Finamore, S. Nuccitelli, P. Carnevali, P. Brigidi, B. Vitali, F. Nobili, R. Rami, I. Garaguso, and E. Mengheri. 2009. Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of gamma delta T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* 15:1526-36.
33. Santagati, M., M. Scillato, F. Patane, C. Aiello, and S. Stefani. 2012. Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*.
34. Sliepen, I., J. Van Damme, M. Van Essche, G. Loozen, M. Quirynen, and W. Teughels. 2009. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res* 88:1026-30.
35. Sliepen, I., M. Van Essche, G. Loozen, J. Van Eldere, M. Quirynen, and W. Teughels. 2009. Interference with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: colonization of epithelial cells under hydrodynamic conditions. *Oral Microbiol Immunol* 24:390-5.
36. Sougioultzis, S., S. Simeonidis, K. R. Bhaskar, X. Chen, P. M. Anton, S. Keates, C. Pothoulakis, and C. P. Kelly. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 343:69-76.
37. Tagg, J. R., and K. P. Dierksen. 2003. Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. *Trends Biotechnol* 21:217-23.
38. Tanzer, J. M., A. B. Kurasz, and J. Clive. 1985. Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R. *Infect Immun* 48:44-50.
39. Tien, M. T., S. E. Girardin, B. Regnault, L. Le Bourhis, M. A. Dillies, J. Y. Coppee, R. Bourdet-Sicard, P. J. Sansonetti, and T. Pedron. 2006. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 176:1228-37.
40. Tooley, K. L., G. S. Howarth, K. A. Lymn, A. Lawrence, and R. N. Butler. 2006. Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. *Cancer Biol Ther* 5:593-600.
41. Tooley, K. L., G. S. Howarth, K. A. Lymn, A. Lawrence, and R. N. Butler. 2011. Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* does not affect mucositis severity or tumor progression in the tumor-bearing rat. *Cancer Biol Ther* 12:131-8.

42. Van Hoogmoed, C. G., G. I. Geertsema-Doornbusch, W. Teughels, M. Quirynen, H. J. Busscher, and H. C. Van der Mei. 2008. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. *Oral Microbiol Immunol* 23:43-8.
43. Wan, F., and M. J. Lenardo. 2010. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res* 20:24-33.
44. Wang, M., S. Ahrne, B. Jeppsson, and G. Molin. 2005. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* 54:219-31.
45. Whitford, E. J., A. G. Cummins, R. N. Butler, L. D. Prisciandaro, J. K. Fauser, R. Yazbeck, A. Lawrence, K. Y. Cheah, T. H. Wright, K. A. Lynn, and G. S. Howarth. 2009. Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 on intestinal mucositis induced by the chemotherapeutic agent, 5-Fluorouracil (5-FU). *Cancer Biol Ther* 8:505-11.
46. Yoon, S. S., and J. Sun. 2011. Probiotics, nuclear receptor signaling, and anti-inflammatory pathways. *Gastroenterol Res Pract* 2011:971938.
47. Zhang, L., N. Li, R. Caicedo, and J. Neu. 2005. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 135:1752-6.
48. Zoumpopoulou, G., B. Foligne, K. Christodoulou, C. Grangette, B. Pot, and E. Tsakalidou. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *Int J Food Microbiol* 121:18-26.

## II. Autres résultats

### II.1. Caractérisation du composé anti-inflammatoire sécrété par la bactérie commensale *Streptococcus salivarius*

### II.2. Mécanisme d'action du composé inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, sécrété par la bactérie commensale *Streptococcus salivarius*

## II.1. Caractérisation du composé anti-inflammatoire sécrété par la bactérie commensale *streptococcus salivarius*

(En préparation)

---

Ghalia Kaci<sup>1</sup>, Joël Doré<sup>2</sup>, S. Dusko Ehrlich<sup>1</sup>, Pierre Renault<sup>1</sup>, Hervé M. Blottière<sup>2†\*</sup> et  
Christine Delorme<sup>1‡\*</sup>.

### Résumé

**Objectif :** *S. salivarius* produit un composé immunomodulateur de la réponse inflammatoire. Ce dernier est présent dans la fraction surnageant <3kDa et est sensible à la digestion par la trypsine. Le but de ce travail est d'identifier les propriétés biochimiques de ce composé et de le caractériser.

**Méthodes :** Purifications sur membranes de filtration, colonne de chromatographie d'hydrophobicité et l'analyse en HPLC couplée à la spectrométrie de masse (MALDI-TOF, chromatographie liquide MS/MS) ont été utilisées pour caractériser la molécule anti-inflammatoire présente dans le surnageant de *S. salivarius*.

**Résultats :** Les purifications biochimiques sur colonne et les analyses nanoLCMS/MS des surnageants de *S. salivarius* ont permis d'identifier une molécule hydrophile et sa formule brute. L'analyse des spectres de fragmentation MS<sup>3</sup> de cette molécule identifiée a permis de déterminer sa masse exacte et sa structure chimique. L'utilisation de 2 à 6 mM de cette molécule candidate reproduit l'inhibition de la voie NF-κB observée avec les surnageants bactériens.

**Conclusion :** *Streptococcus salivarius*, une bactérie commensale du tractus digestif humain sécrète un métabolite capable d'inhiber l'activation de la voie NF-κB dans les cellules épithéliales intestinales humaines les HT-29.

## Introduction

Dans le contexte de réponse inflammatoire, les bactéries commensales ou probiotiques comme les *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont capables de moduler la réponse immunitaire et de réduire le processus d'inflammation dans des modèles cellulaires (Candela et al., 2008; Ewaschuk et al., 2008; Tien et al., 2006). Dans ces modèles, certaines activités anti-inflammatoires nécessitent un contact entre les bactéries et les cellules eucaryotes. Cependant, pour d'autres, des facteurs bactériens sécrétés ont été partiellement caractérisés (Frick et al., 2007b; Menard et al., 2004). Au niveau de l'intestin, les mécanismes de ces effets anti-inflammatoires ont été parfois partiellement identifiés et souvent ils inhibent la voie NF- $\kappa$ B.

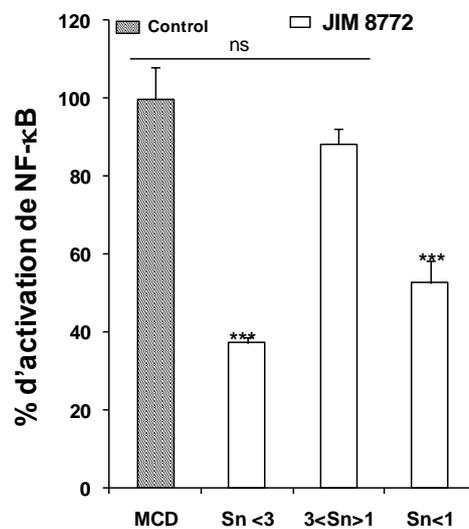
Nos travaux sur les interactions des bactéries commensales du groupe salivarius avec l'hôte ont montré que cette espèce présentait des propriétés immunomodulatrices. En effet, les surnageants de culture des différentes souches de ce groupe modulent la réponse immunitaire *in vitro* via leurs effets répresseurs sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans des cellules humaines (HT-29, Caco-2 et THP-1) (Kaci et al., 2011a). Les propriétés d'inhibition des surnageants de *S. salivarius* ont été confirmées par la réduction de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 dans des cellules HT-29 activées par le TNF $\alpha$ . De plus, les bactéries vivantes, à la différence des bactéries tuées par la chaleur, inhibent la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules HT-29. Les propriétés anti-inflammatoires de ces dernières ont été confirmées *in vivo* sur un modèle murin présentant une inflammation digestive de type colite (modérée, sévère) induite au TNBS. L'administration par voie intra-gastrique pendant 5 jours les bactéries vivantes, à des groupes de souris les protégeaient (environ 50%) des deux types de colite (modérée, sévère) induite au TNBS. Aucune protection n'a été observée dans le groupe prétraité par des bactéries tuées par la chaleur, montrant l'importance d'un métabolite actif dans l'effet immunomodulateur exercé par *S. salivarius* (Kaci et al, en préparation).

Ces travaux ont montré que *S. salivarius* produit et sécrète un composé anti-inflammatoire dans le surnageant de culture bactérienne. Un tamisage moléculaire a montré que ce composé est présent dans la fraction inférieure à 3kDa de surnageant de culture. Cette fraction reste active après un traitement à la chaleur, mais perd son activité après un traitement à la trypsine. L'objectif donc de cette étude consiste à identifier les propriétés biochimiques du composé actif et de caractériser cette molécule.

## Résultats

### 1. Masse moléculaire du composé anti-inflammatoire sécrété par *S. salivarius*

Pour identifier la masse moléculaire du composant inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, la fraction du surnageant inférieur à 3kDa décrite dans la première étude (Kaci et al., 2011a) a été filtrée sur une membrane de filtration 1kDa. Les différentes fractions obtenues (> et < à 1kDa) ont été testées pour leurs effets sur la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales humaines ; les HT-29 et les monocytes THP-1.



**Figure 1 : *S. salivarius* sécrète un facteur inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B de masse moléculaire inférieur à 1kDa.**

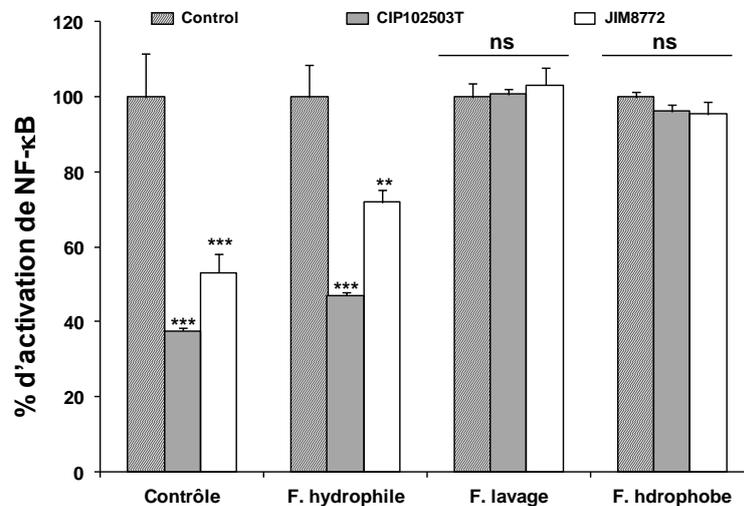
Les fractions surnageants de la souche JIM8772 (Sn) obtenues après filtration de la fraction Sn < 3kDa sur une membrane de 1kDa (PLAC06210) ont été testées pour leurs effets sur la voie NF- $\kappa$ B activée par le TNF $\alpha$  (10ng/ml) dans les cellules HT-29/kB-luc-E. Les résultats représentent une des trois expériences indépendantes. *P values* sont < 0.05 (\*), < 0.025 (\*\*) et < 0.01 (\*\*\*).

Comme illustrés par la **Figure 1**, les fractions surnageant < 3kDa et <1kDa de *S. salivarius* JIM8772 répriment l'activation NF- $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$  dans les cellules HT-29. Aucune activité inhibitrice n'est présente avec la fraction surnageant supérieure à 1kDa. Ces résultats indiquent que le composé anti-inflammatoire est de masse moléculaire inférieure à 1kDa. Les mêmes résultats sont obtenus avec les fractions surnageants de la souche CIP102503T et avec les cellules THP-1.

### 2. Affinité pour l'eau du composé actif

Dans le but d'identifier les propriétés biochimiques en particulier l'affinité pour l'eau du composé actif, la fraction surnageant < 1kDa a été purifiée sur une colonne

chromatographique d'hydrophobicité type tC18. Les différents éluats (hydrophile, hydrophobe) et les différentes fractions de lavage ont été analysées pour leurs effets sur l'activité NF- $\kappa$ B dans les modèles cellulaires humaines (HT-29, THP-1).



**Figure 2 : Polarité du composé inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B produit par *S. salivarius*.** Les fractions surnageants (Sn) <1KDa des souches CIP102503T et JIM8772 ont été purifiées sur une colonne d'hydrophobicité Sep-Pak (Sep-Pak plus tC18; WAT036810, waters). Après l'éluion par une solution d'acetonitrile et TFA, les fractions sont testées sur la voie NF- $\kappa$ B activée par le TNF $\alpha$  (10ng/ml) dans les cellules HT-29/ $\kappa$ B-luc-E. F. hydrophile: Fraction non retenue par la colonne. F. hydrophobe: Fraction fixée sur la colonne puis éluée avec 60% d'acetonitrile et 0.1% TFA. F. Lavage: Fraction de lavage de la colonne avec 0.0115% TFA avant l'éluion. Les résultats représentent une des trois expériences indépendantes. *P values* sont < 0.05 (\*), < 0.025 (\*\*) et <0.01 (\*\*\*)

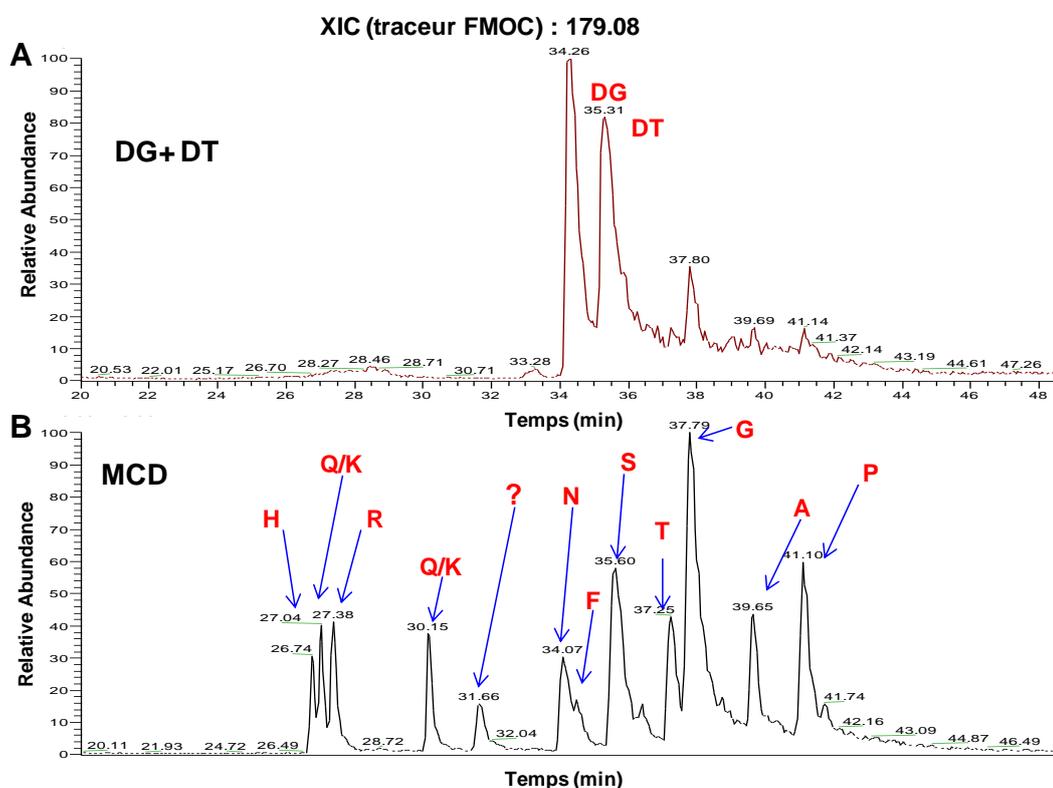
Les résultats de la **Figure 2** montrent que l'activité inhibitrice de la voie NF- $\kappa$ B est présente dans les fractions surnageants hydrophiles des deux souches testées. Aucun effet sur l'activation NF- $\kappa$ B n'a été obtenu avec les fractions de lavages et hydrophobes. Les différents tampons utilisés dans cette expérience n'ont également pas présenté d'effet sur l'activation de NF- $\kappa$ B (Résultats non présentés). Ces résultats indiquent que le composé anti-inflammatoire sécrété par *S. salivarius* est hydrophile. Les mêmes résultats sont obtenus avec les cellules THP-1

### 3. Analyse des produits dérivés par LC-MS/MS

Pour caractériser les molécules hydrophiles présentes dans les surnageants de *S. salivarius*, les échantillons dérivés ont été analysés par LC-MS/MS à la plateforme d'analyse protéomique PAPPSO. Ces dérivés ont été séparés par chromatographie liquide en phase inverse suivant leur hydrophobicité. Ces molécules séparées sont analysées en ligne *via* un couplage de la spectrométrie de masse. Après fragmentation des dérivées, les spectres générés sont analysés manuellement pour déterminer les masses moléculaires correspondant à chaque molécule associée au traceur FMOC.

### a. Efficacité de la méthode de dérivation

Pour vérifier l'efficacité de la dérivation, deux dipeptides hydrophiles ; Thréonine-Aspartate (T-D) et Glycine-Aspartate (G-D) ont été dérivés au FMOC et analysés par HPLC dans des conditions identiques que les échantillons surnageants.



**Figure 3 : Profils HPLC des di-peptides témoins et du milieu MCD dérivés avec le FMOC.** Les échantillons dérivés et dilués à 1/100 dans le tampon de loading buffer HPLC ont été analysés avec l'analyseur ; nanoESI-LTQ-Orbitrap perte de neutre avec SID 60 volts dans la source. **A**: Profil des di-peptides témoins (DG, DT). **B**: Profil du milieu de culture MCD.

Comme montré sur la **Figure 3**, plusieurs signaux du traceurs FMOC ont été observés sur le profil d'éluion des molécules dérivées. Chaque signal est ensuite fragmenté pour éliminer le traceur FMOC. L'analyse des spectres de fragmentation a permis d'identifier des masses moléculaires des composés dérivés qui sont indiqués sur la **Figure 3**. Les deux signaux observés sur **Figure 3A** correspond aux masses des deux peptides témoins DG, DT. Les signaux de la **Figure 3B** représentent les différents acides aminés présents dans le milieu de culture MCD. Ces résultats montrent que la méthode de dérivation fonctionne sur des peptides et des petits composés comme les acides aminés. Ainsi, la molécule FMOC est facilement éliminée pour permettre de caractériser les composés dérivés. Enfin, le mode d'acquisition en SM est efficace puisque les deux di-peptides témoins ont été caractérisés.

#### ***b. Analyse des composés dérivés du surnageants de *S. salivarius****

Nous avons montré que le composé actif présent dans les surnageants de *S. salivarius* était sensible à la digestion avec la trypsine couplée à des billes magnétiques (Kaci et al., 2011a). Nous avons utilisé ce critère pour identifier la molécule active. Les profils HPLC du milieu MCD et des surnageants traités ou non avec la trypsine ont été comparés entre eux pour une analyse différentielle. La comparaison des profils HPLC de ces échantillons n'ont pas montré de différences significatives au niveau des signaux dominants mesurés en SM. Dans ces profils, les signaux dominants sont constitués principalement du panel d'acides aminés présents dans le milieu de culture bactériens (MCD) (résultats non montrés).

L'ensemble de cette série de résultats a permis de valider une méthode de dérivation pour analyser des composés hydrophiles. En revanche l'abondance des signaux correspondant aux acides aminés rajoutés dans le milieu MCD interfère avec l'analyse en profondeur des composés bactériens produits.

### **4. Caractérisation de la molécule anti-inflammatoire produite par *S. salivarius***

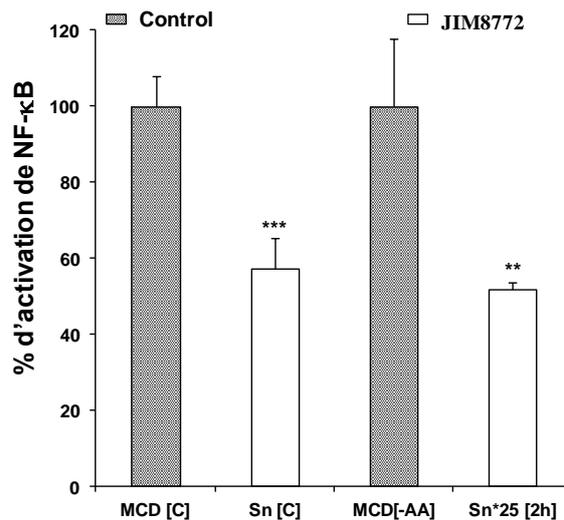
Pour éliminer le bruit de fond constitué des signaux des AA du milieu MCD, nous avons mis au point une stratégie de culture des souches de *S. salivarius* dans un milieu sans AA. Les capacités anti-inflammatoires des surnageants obtenus sur ce milieu ont été évaluées pour leur effet sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les modèles cellulaires.

#### ***a. *S. salivarius* est métaboliquement active en milieu dépourvu d'acides aminés***

Les culots bactériens de *S. salivarius* JIM8772 et CIP102503T prélevés à une DO= 0,5 ont été lavés deux fois et concentrés 25 fois, resuspendu dans le milieu MCD (-AA) et incubés 2h à 37°C. Les mesures de pH des surnageants obtenus ont montré l'acidification de ces derniers pendant l'incubation. Ces résultats indiquent que les souches bactériennes sont métaboliquement actives et continuent à sécréter des métabolites dans le milieu.

#### ***b. Effet des surnageants obtenus en resting cells sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B***

Pour vérifier la sécrétion de la molécule active par *S. salivarius* dans cette expérience en « resting cells », les surnageants ont été testés pour leur effet inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules HT-29.



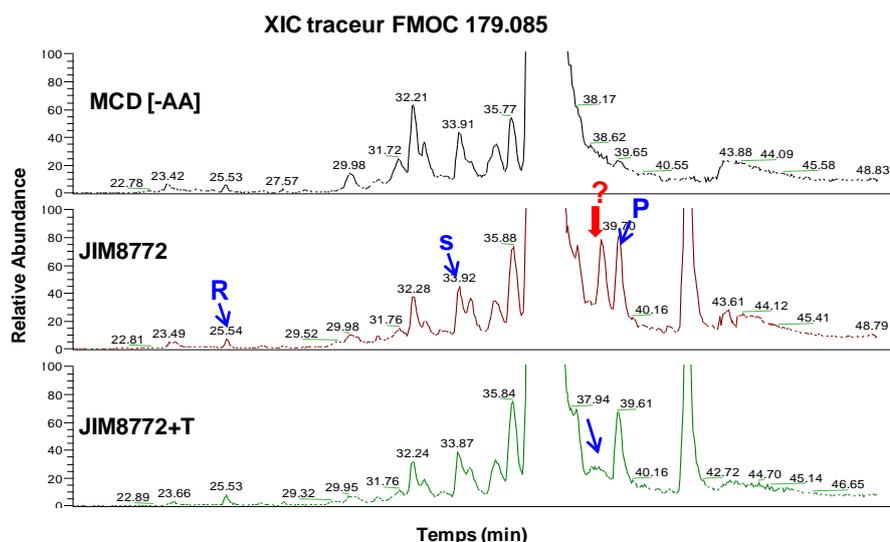
**Figure 4 : Inhibition de l'activation NF-κB par les surnageants de *S. salivarius* obtenus en resting cells sur milieu MCD sans acides aminés.** Les surnageants (Sn) et (Sn\*25) de la souche JIM8772 obtenues sur les milieu MCD complet [C] ou MCD sans acides aminés [-AA] ont été testés pour leurs effets sur la voie NF-κB activée par le TNFα (10ng/ml) dans les cellules HT-29/kB-luc-E. MCD [C]: milieu MCD complet, Sn[C]: surnageant obtenu après culture sur MCD complet. Sn\*25[2h]: surnageant obtenu après 2h de resting cells sur MCD sans AA d'un culot bactérien cultivé sur le milieu MCD complet et concentré 25 fois. Les résultats représentent une des trois expériences indépendantes. *P values* sont < 0.05 (\*), < 0.025 (\*\*) et < 0.01 (\*\*\*).

Les résultats illustrés par la **Figure 4** montrent que le surnageant de la souche JIM8772 obtenus après « resting cells » présente un effet répresseur de 50% sur l'activation de la voie NF-κB. Cet effet est similaire à celui obtenu avec des surnageants après culture sur un milieu MCD complet. Des résultats semblables ont été observés avec la souche CIP102503T. Ces résultats indiquent que les souches de *S. salivarius* continuent à sécréter la molécule inhibitrice de la voie NF-κB dans un milieu dépourvu d'acides aminés.

Ces observations ouvrent donc la possibilité d'analyser les composés bactériens par HPLC en absence d'acides aminés provenant du milieu MCD.

#### *c. Profils HPLC des composés hydrophiles obtenus en milieu dépourvu d'acides aminés*

Les fractions hydrophiles des surnageants de *S. salivarius* CIP102503T, JIM8772 et JIM8777 obtenues en « resting cells » et traitées ou non avec la trypsine ont été dérivées au FMOC. Les dérivés ont été analysés par LC-MS et les signaux des profils HPLC obtenus comparés entre eux pour réaliser une analyse différentielle (**Figure 5**).

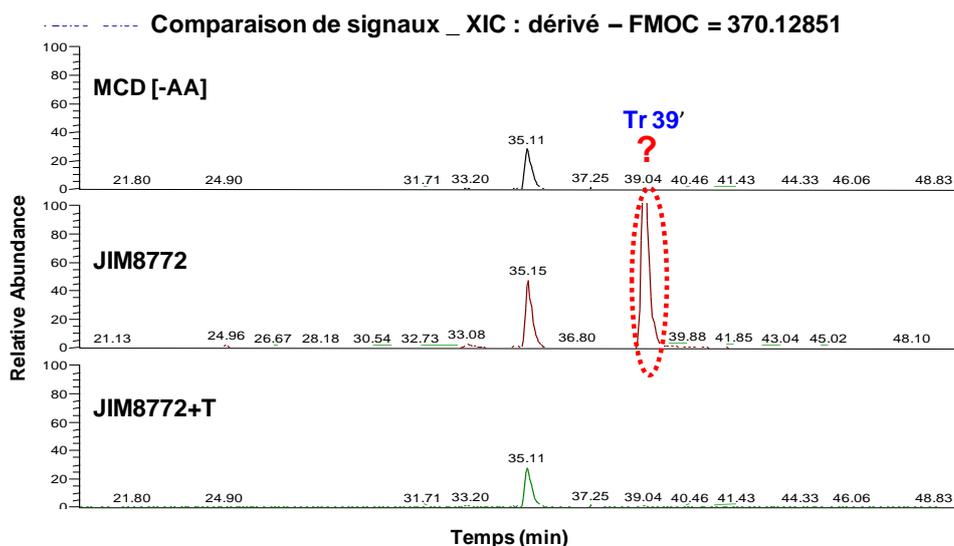


**Figure 5 : Comparaison de signaux MS des profils HPLC des fractions surnageants de *S. salivarius* et le milieu MCD après extraction du traceur (XIC-FMOC).** Les échantillons dérivés avec le FMOC et dilués 1/100 ont été analysés avec nano-LCMS. Profils HPLC du milieu MCD et des fractions surnageants hydrophiles de la souche JIM8772. MCD [-AA]: milieu de culture sans acides aminés. JIM8772: Fraction surnageant hydrophile obtenue en resting cells sur milieu MCD [-AA] traitée avec 200 unités/ml de trypsine (JIM8772+T) ou non (JIM8772). Présentation d'un des trois profils de souches testées, l'expérience a été réalisée trois fois.

La comparaison des signaux du profil HPLC du milieu MCD (-AA) avec ceux du profil du surnageant de la souche JIM8772 montre qu'il y a des différences entre le milieu de culture seul et le surnageant bactérien. On observe que le surnageant bactérien contient plusieurs acides aminés (R ; Acide glutamique, S ; Serine et P ; Proline) qui sont absents dans le milieu de culture. Ils sont plus visibles en absence des signaux correspondant aux AA rajoutés dans le milieu. L'analyse en profondeur des signaux des profils de chaque échantillon a montré une différence marquante située dans le massif des temps de rétentions ; Tr 22-48 min. On observe un signal avec un Tr=39 min, présent uniquement dans le surnageant bactérien non traité avec la trypsine.

### Analyse du pic d'intérêt

Pour isoler le signal du pic d'intérêt à Tr=39 min des autres signaux du profil HPLC, nous avons analysé les signaux mesurés en spectrométrie de masse (XIC) associée au pic d'intérêt (ion de masse 370.XX) tout au long de la séparation chromatographique.



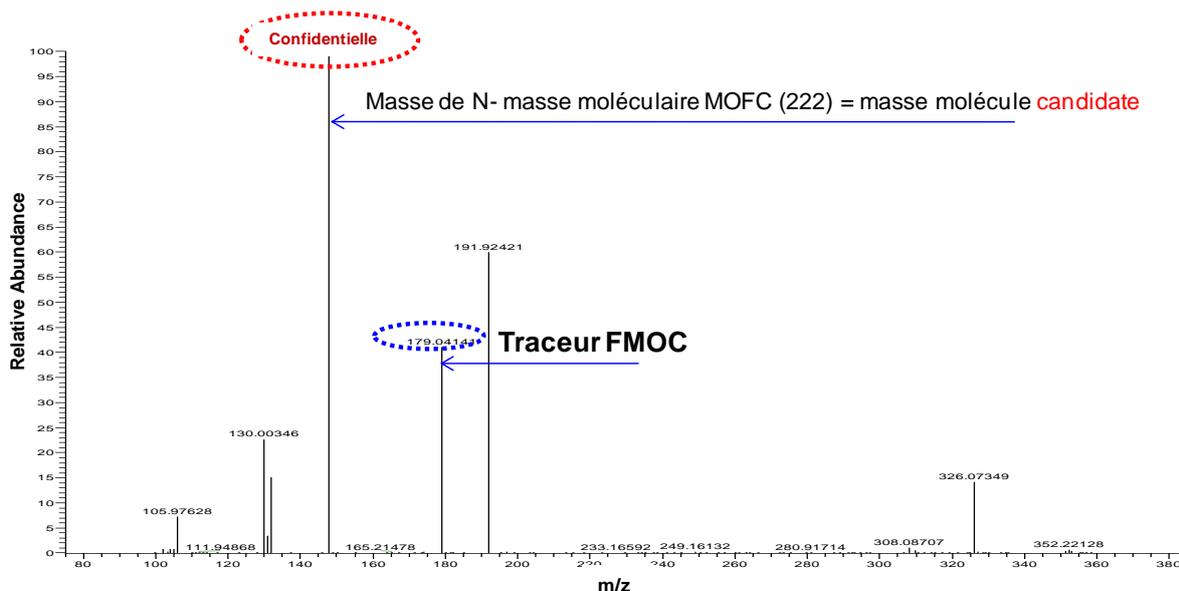
**Figure 6 :** Comparaison de signaux MS du profil HPLC du pic d'intérêt identifié dans les fractions surnageants de *S. salivarius*. Le pic d'intérêt identifié dans le surnageant de *S. salivarius* a été analysé en nano-LCMS avec méthode; FT\_NLFmoc\_MS3\_20100705. Les Profils HPLC des fractions surnageants hydrophiles (traitées ou non avec trypsine) obtenus ont été analysés par MS.

Les profils d'éluion de la molécule analysée montrent un signal avec un Tr de 35.11 présent dans tous les échantillons. En revanche, le signal correspondant à notre pic d'intérêt Tr=39 est retrouvé dans le profil surnageant de la souche JIM8772. Ce pic à Tr=39 est absent dans les profils du MCD (-AA) et surnageant traité avec la trypsine (JIM8772T) (**Figure 6**). La molécule ainsi isolée après dérivation avec le Fmoc est donc un candidat à identifier comme molécule active produite par *S. salivarius*.

### **Masse moléculaire de la molécule d'intérêt**

Pour identifier la masse du composé d'intérêt, le pic de Tr=39 a été fragmenté et les spectres générés de type MS<sup>3</sup> et MS/MS ont été analysés automatiquement. Après l'élimination du traceur Fmoc, ces spectres ont été traités manuellement sur la base de précision en masse.

On observe sur la **Figure 7**, le spectre de fragmentation de la molécule Fmoc de masse 179 Da et celui de la molécule d'intérêt avec une masse moléculaire B (confidentielle). L'analyse fines de ces fragments a permis d'identifier la formule brute de la molécule candidate (confidentielle).



**Figure 7 : Fragmentation du pic d'intérêt de temps de Tr=39 min du profil HPLC de la fraction surnageant hydrophile de la souche JIM8772. MS<sup>2</sup> LTQ sur m/z = 370.13 Tr = 39 min. Les résultats présentent un des profils de fragmentation d'un pic avec Tr=39 min d'une des trois souches testées des deux expériences indépendantes. N: Molécule candidate dérivée.**

### Caractérisation du pic d'intérêt

Les spectres de fragmentation du pic d'intérêt générés par la plateforme PAPPSSO ont été analysés avec un logiciel de la plateforme d'Exploitation du Métabolisme (INRA, Clermont-Theix). Cette analyse a permis d'identifier la structure chimique et de proposer une correspondance avec la molécule nommée « candidate » ou « active » (**figure 8**).

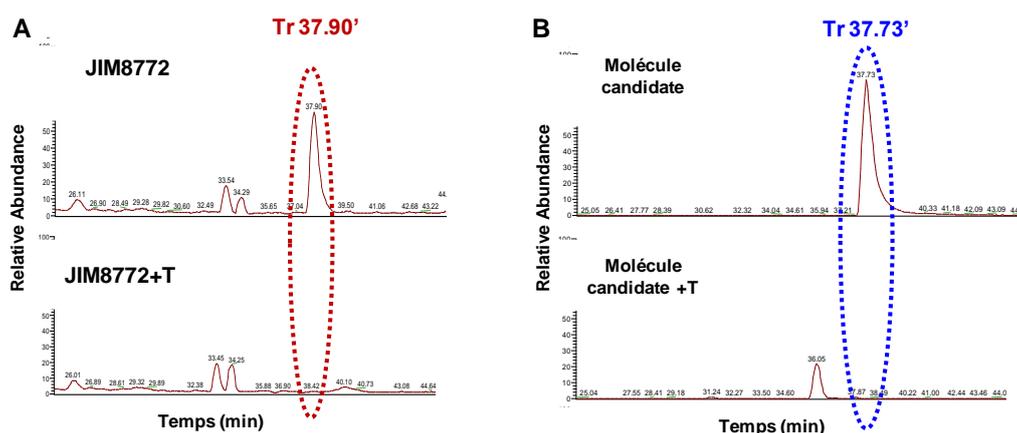


Formule brute: **A**  
 Masse Exacte: **N**  
 Hypothèse: **molécule active**

**Figure 8 : Structure chimique probable des scans de fragmentation du pic d'intérêt (Tr=39 min) isolé du profil HPLC des surnageants de *S. salivarius*. Le scans des spectres de fragmentation du pic d'intérêt ont été analysés avec un logiciel de la plateforme d'Exploitation du Métabolisme (INRA, Clermont-Theix).**

## 5. Analyse de la molécule candidate par HPLC

Une solution de 50 mM de la molécule candidate synthétisée chimiquement, et traitée ou non avec la trypsine a été dérivée au FMOc. Ces dérivées ont été analysées par nanoLCMS/MS. Le profil HPLC et les spectres de fragmentation obtenus sont comparés à ceux identifiés dans les surnageants de *S. salivarius*.

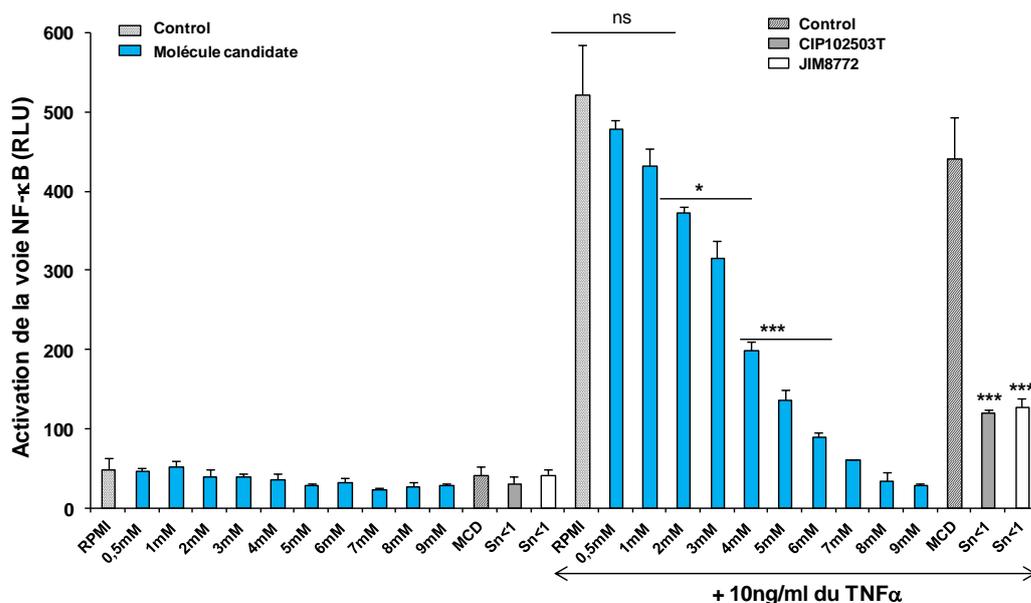


**Figure 9** : Comparaison des profils HPLC de la molécule candidate synthétisée chimiquement et celle identifiée dans le surnageant de *S. salivarius*. Profils HPLC des échantillons dérivés avec le Fmoc et analysés en nano-LC/MS : méthode; FT\_NLFFMOC\_MS3\_20100705. **A**: Fraction surnageant hydrophile de la souche JIM8772 traitée avec 200 unités/ml de trypsine (JIM8772+T) ou non (JIM8772). **B**: Molécule candidate synthétisée chimiquement traitée avec 200 unités/ml de trypsine (molécule candidate +T) ou non (molécule candidate).

Les résultats d'analyse MS<sup>3</sup> (**Figure 9A**) confirment la présence d'un pic à Tr= 37.73 min dans le surnageant de la souche JIM8772 qui est absent dans la fraction traitée avec la trypsine. Le profil HPLC de la molécule candidate de synthèse chimique (**Figure 9B**) montre un pic élué au même temps de rétention que celui identifié dans les surnageants bactériens. Ce pic disparaît aussi après traitement avec la trypsine. De plus, l'analyse des spectres de fragmentations des deux profils a montré que les deux molécules étaient identiques. Ces résultats confirment l'identification de la molécule candidate.

## 6. Effet de la molécule candidate sur la voie NF-κB

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de la molécule candidate synthétisée chimiquement. Des concentrations de 0.1 à 10 mM de cette molécule ont été testées sur l'activation de la voie NF-κB dans les cellules épithéliales (HT-29) et les monocytes (THP-1).

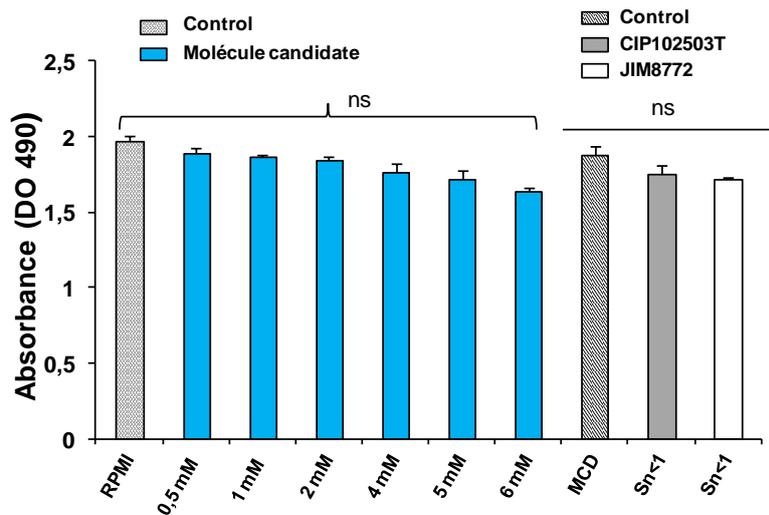


**Figure 10 : Effet de la molécule candidate sur l'activation de la voie NF-κB.** Les concentrations de la molécule candidate de synthèse chimique préparées dans le milieu RPMI, ont été testées pour leurs effets sur la voie NF-κB activée par le TNFα (10ng/ml) dans les cellules HT-29/kB-luc-E. Les histogrammes représentent l'activité luciférase relative (RLU) produite par les cellules. RPMI: milieu de culture des cellules HT-29. MCD: milieu de culture des souches de *S. salivarius* (CIP102503T et JIM8772). Sn<1: fraction surnageant bactérien inférieure un 1kDa. Les résultats représentent une des trois expériences indépendantes. Tous les résultats de la gamme ont été comparés au contrôle (RPMI+TNFα), et ceux de Sn ont été comparés au contrôle (MCD+TNFα). *P values* sont > 0.05 (ns: non sens), < 0.05 (\*), < 0.025 (\*\*\*) et < 0.01 (\*\*\*).

Comme montré sur la **Figure 10**, les concentrations inférieures à 2 mM n'exercent aucun effet sur la voie NF-κB et les celles supérieures à 6 mM sont toxiques pour les cellules. En revanche, les concentrations de 2 à 6 mM répriment l'activation NF-κB d'une manière dose dépendante. Ces dernières concentrations reproduisent l'effet inhibiteur des surnageants bactériens. Des résultats similaires ont été obtenus dans le modèle monocyttaire (THP-1) activé par le LPS (Lipopolysaccharide) (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que la molécule identifiée est une bonne candidate pour expliquer les capacités anti-inflammatoires des surnageants de *S. salivarius*.

## 7. Effet du composé identifié sur la viabilité cellulaire

Dans le but de vérifier que l'inhibition de l'activation NF-κB par la molécule candidate n'est pas un artefact d'altération des cellules, la viabilité de ces dernières a été évaluée avec le MTS parallèlement à un test NF-κB.



**Figure 11 : Effet de la molécule candidate sur la viabilité cellulaire (Test MTS).** Les solutions de la molécule candidate ont été testées pour leurs effets sur la viabilité des cellules HT-29/kB-luc-E. La quantité de MTS réduite par les cellules viables est évaluée par la mesure de la DO à 490nm. Les résultats représentent une des trois expériences indépendantes. *P values* sont  $> 0.05$  (ns: non sens),  $< 0.05$  (\*),  $< 0.025$  (\*\*) et  $< 0.01$  (\*\*\*) .

On observe sur la **Figure 11** que les concentrations de 2-6 mM de la molécule candidate n'affecte pas la viabilité des cellules HT29. En revanche, les concentrations supérieures à 7 mM diminuent d'environ 50% la viabilité cellulaire (résultats non montrés). Ces résultats indiquent que les concentrations 2-6 mM qui exercent des effets anti-inflammatoires semblables à ceux des surnageants bactériens ne sont pas toxiques pour la cellule. Ces résultats confirment que l'effet inhibiteur de l'activation NF- $\kappa$ B est probablement lié à cette molécule.

## Discussions

De nombreuses études expérimentales ont montré que certaines bactéries commensales exercent des capacités anti-inflammatoires par l'intermédiaire de leurs produits de sécrétion. Nos travaux sur les propriétés immunomodulatrices de *S. salivarius*, ont suggéré que cette bactérie produit un composé de nature peptidique qui inhibe l'élément clef de la réponse inflammatoire intestinale, la voie NF- $\kappa$ B (Kaci et al., 2011a). Des métabolites bactériens de petites tailles avec des effets répresseurs de la voie NF- $\kappa$ B ont été montrés chez des bactéries commensales ou chez certains probiotiques comme *Streptococcus thermophilus* 065 et *Lactobacillus plantarum* (Menard et al., 2004; Petrof et al., 2009; Sokol et al., 2008). La nature exacte de ces métabolites bactériens reste inconnue.

Dans cette étude, nous avons caractérisé un métabolite candidat avec des effets anti-inflammatoires dans les surnageants de *S. salivarius*. Les purifications biochimiques sur membranes et colonne chromatographique ont montré que ce peptide est hydrophile et de masse moléculaire inférieure à 1kDa. Ces résultats suggèrent que ce dernier est composé de moins de dix acides aminés. Les étapes d'identification et de caractérisation de ce peptide ont permis de valider une méthode de dérivation des composés bactériens hydrophiles. Cette méthode a été standardisée pour dériver et étudier des peptides hydrophiles du lait (Roturier et al., 1995). Son efficacité à dériver des métabolites bactériens a été confirmée avec les analyses SM et HPLC des dérivés des surnageants de *S. salivarius*. Ces analyses ont montré que la molécule FMOC est capable de dériver aussi des métabolites bactériens possédant une fonction amine libre comme les acides aminés présents dans le milieu de culture. Les résultats d'HPLC ont permis d'identifier un pic d'intérêt présent uniquement dans les surnageants de culture non traités avec la trypsine. Ces résultats vont dans le même sens avec ceux obtenus *in vitro* et qui ont montré que les surnageants traités avec la trypsine perdaient leurs capacités inhibitrices de la voie NF- $\kappa$ B. Nous avons montré également que les fractions non dérivées ne présentent aucun effet sur la voie NF- $\kappa$ B (Résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que le métabolite répresseur se retrouve probablement dans la fraction dérivée.

L'étude fine du pic d'intérêt et de ces profils de fragmentation MS<sup>3</sup> ont permis d'identifier la formule brute du composé. L'analyse par un logiciel ces spectres de fragmentations générés du pic d'intérêt ont permis de caractériser la structure chimique de ce composé. La molécule de synthèse chimique, dérivée avec FMOC est analysée par HPLC, présente un profil d'élution identique à celui du pic identifié dans les surnageants bactériens.

Ce résultat suggère et renforce l'hypothèse que la molécule candidate testée est identique à celle identifiée dans les surnageants de *S. salivarius*.

Nous avons montré que les solutions 2-6 mM de cette molécule reproduisent l'effet inhibiteur des surnageants sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales intestinales les HT-29 et les monocytes les THP-1.

Certaines études ont déjà caractérisé des métabolites bactériens avec des effets anti-inflammatoires. Les dérivés du peroxyde d'hydrogène en particulier les ROS (Reactive Oxygen Species) générés par des bactéries commensales du microbiote présentent des effets anti-inflammatoires. La bactérie *Lactobacillus crispatus* M247 par l'intermédiaire de l' $H_2O_2$  qu'elle produit, augmentait l'expression de PPAR $\gamma$  et sa localisation nucléaire, et inhibait la voie NF- $\kappa$ B dans les colonocytes intestinales (Voltan et al., 2008). Les bactéries commensales vivantes, comme *Lactobacillus rhamnosus* et *Bacteriodes thetaiomicron* induisent et réactivent les ROS générées par les cellules épithéliales qui bloquent l'addylation de culline-1 (étapes critiques de l'activation NF- $\kappa$ B) et par conséquent inhibe l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Kumar et al., 2007). En outre, les produits de fermentation bactériens, comme les acides organiques à courtes chaînes en particulier le butyrate induit les ROS des cellules épithéliales de l'intestin pour inhiber l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Kumar et al., 2009a).

L'ensemble des résultats de cette étude ont permis d'identifier et de caractériser un métabolite bactérien sécrété dans les surnageants de *S. salivarius*, une bactérie commensale de l'écosystème intestinale. L'utilisation de ce métabolite de synthèse chimique mime dans les cellules, l'effet répresseur des surnageants bactériens sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Pour compléter ces travaux, il serait important de connaître les quantités de ce composé présentes dans les surnageants de *S. salivarius*.

La voie NF- $\kappa$ B, constitue l'une des signalisations centrales impliquée dans la réponse inflammatoire intestinale, son inhibition par des métabolites produites par des bactéries commensales du microbiote intestinal constitue l'une des pistes de recherche majeure dans le domaine de la pharmacomodulation de l'inflammation et ouvre de nouveaux horizons thérapeutiques pour le traitement des pathologies inflammatoires notamment les MICI.

## **Matériels et Méthodes**

### **Souches de *S. salivarius* et culture**

Les souches de *S. salivarius* utilisées dans cette étude ont été isolées de sources différentes, la souche CIP102503T est isolée d'hémoculture à New York (USA) en 1950 et les deux autres JIM8772 et JIM8777 sont isolées des cavités buccales en France (2004).

Les souches ont été cultivées sur des milieux M17 et MCD complet (milieu chimiquement défini) supplémenté avec 1% de glucose (Kaci et al., 2011a), ensemencés à 2% et incubés à 37°C dans des conditions d'anaérobiose.

### **Resting cells**

Une culture de 1 litre de milieu MCD complet a été incubée à 37°C jusqu'à une DO (Densité Optique) de 0.5. Cette culture a été centrifugée à 3000 rpm pendant 5 min et les culots bactériens ont été lavés deux fois avec du milieu MCD incomplet préchauffé à 37°C. Le culot de bactéries a été concentré 25 dans ce le milieu MCD et incubé 2h à 37°C. Le milieu MCD incomplet est dépourvu des acides aminés (-AA).

### **Préparation des différentes fractions du surnageant de *S. salivarius***

Les surnageants ont été obtenues après centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes des cultures bactériennes cultivées toute la nuit (ON). Ensuite, ils ont été filtrés sur membrane de 0.22 µm puis fractionnés par passage sur des tamis moléculaires de 10 et 3 kDa (Millipore). Les fractions inférieures à 3 kDa ont été filtrées à nouveau sur une membrane de 1 kDa (PLAC06210). Enfin, toutes les fractions ont été congelées à -80°C.

### **Digestion par la trypsine**

Les fractions surnageants ont été traitées avec la trypsine couplées à des billes magnétiques (200 U/ml ; Mag-Trypsin 635646; Ozyme). 1 ml de la fraction surnageant ajusté à pH=8 avec une solution de NaOH (5N) a été mis en contact avec 200 U/ml de billes de trypsine préalablement lavées avec une solution de 0.1M de NaHCO<sub>3</sub> et de l'eau distillée. Le mélange surnageant-trypsine a été incubé à 37°C pendant 8-24h sous agitation. Les billes magnétiques de trypsine ont été ensuite éliminées avec un dispositif « magnetic separator » et les surnageants ont été filtrés sur une membrane de 0.22µm. Ces derniers ont été ajustés à nouveau au pH des surnageants en fin de culture (pH=5.5) avec une solution de HCL (6N).

## Purification sur colonne chromatographique

Le surnageant bactérien a été purifié en fonction des caractères hydrophile/hydrophobe sur une colonne d'hydrophobicité. Les fractions surnageants inférieures à 1kD ont été fractionnées sur une colonne type tC18 (Sep-Pak plus tC18; WAT036810, waters) activée avec 5 ml de méthanol 100% et lavée avec 40 ml de tampon A (0.115% TFA). La colonne a été lavée à nouveau avec 40 ml de tampon A, et les fractions hydrophobes ont été éluées goutte à goutte avec 2 ml de tampon B (0.1% TFA et 60% acetonitrile).

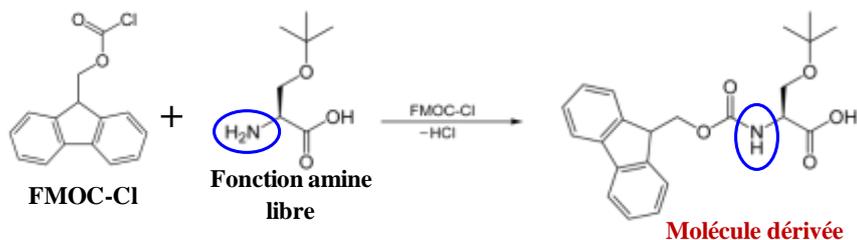
## Dérivations des fractions hydrophiles

Pour une analyse en HPLC, les fractions hydrophiles des surnageants bactériens ont été rendus hydrophobes, en utilisant une méthode de dérivation avec la molécule FMOC (**F**luorenyl**m**ethyloxy-carbonyl**cl**horide) (Roturier et al., 1995). 0.4 ml des fractions hydrophiles lyophilisées (Speed-Vac) ont été ressuspendues dans un volume de 0.4 ml de sodium borate buffer (0.5 M, pH 7.8) et 0.4 ml d'agent FMOC (5.8 mM dans acétone) pour être dérivés (Einarsson et al 1983). Après 30 min d'incubation à 20°C, les échantillons ont été mélangés à l'aide d'un vortex pendant 45 s, et l'excès de la molécule FMOC a été extrait avec 0.8 ml de pentane-éthyle acétate (80:20). La phase aqueuse contenant les molécules dérivées (hydrophobes) a été lyophilisée au Speed-Vac, et la poudre obtenue a été ressuspendues dans 2 ml de TFA 0.1%. Enfin, ce dernier mélange a été purifié sur une colonne hydrophobe tC18 et la fraction hydrophobe est lyophilisée à nouveau avec le Speed-Vac.

Pour vérifier l'efficacité de la méthode de dérivation, deux solutions de di-peptides hydrophiles témoins (Thréonine-Glycine (T-G) et Glycine-Aspartate (G-D)) ont été dérivées au même temps que les surnageants bactériens.

## Principe de la dérivation des composés hydrophiles avec le FMOC

La méthode de dérivation avec le FMOC-Cl repose sur l'interaction de la molécule FMOC (molécule cyclique) après le départ du groupe Cl avec une fonction amine libre (NH<sub>2</sub>) des molécules hydrophiles (**Figure 13**). Une fois ces fractions dérivées, les molécules hydrophobes sont analysées en HPLC.



**Figure 13 : Principe de la dérivation avec du Fluorenylméthylloxycarbonyl-chloride (Fmoc-Cl).** La molécule Fmoc-Cl après le départ de Cl, réagit avec la fonction amine libre (NH<sub>2</sub>) des molécules hydrophiles à dériver. La réaction a été réalisée pendant 30 min à 20°C en présence de sodium borate buffer (0.5 M, PH7.8). L'excès du Fmoc a été éliminé avec du pentane-éthyle acétate (80:20).

## Analyses en HPLC des molécules dérivées

Les échantillons dérivés ont été dilués au 1/100 et 5 µl de chaque échantillon ont été injectés en nanoLC sur précolonne PepmapC18 (5\*0.3mm , 5µm, 100A) à un débit de 20 µl min<sup>-1</sup>. Après 4 min la pré-colonne est mise en ligne avec la colonne analytique PepmapC18 (150\*0.075 mm, 3µm, 100A) et les molécules dérivées sont éluées successivement par un gradient croissant d'acétonitrile en présence d'acide formique (0.1%). Les mesures de masse sont réalisées respectivement dans l'analyseur de masse Orbitrap pour les précurseurs (molécules dérivées) et dans la trappe linéaire (LTQ) pour les fragments de MS<sup>2</sup> et de MS<sup>3</sup> générés également dans la trappe linéaire. Une étape de fragmentation dans la source a été mise en place afin de générer un ion traceur facilitant la détection des molécules dérivées par le Fmoc (ions de masse 179.XX). Le signal mesuré en spectrométrie de masse (XIC) associé au traceur 179.XX est extrait tout au long de la séparation chromatographique, et permet d'établir un profil d'éluion des molécules dérivées. Ces profils sont ensuite comparés entre eux pour réaliser une analyse différentielle entre échantillons distincts. Les spectres de fragmentation de type MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup> sont générés automatiquement après collision de type CID et analysés successivement et automatiquement tout au long de la séparation chromatographique. Ces spectres de fragmentation ont été traités manuellement sur la base de la précision en masse et des fragments observés en se focalisant principalement sur les ions dérivés différentiellement abondant entres conditions.

## Gamme de la molécule candidate

Une gamme de la molécule candidate de diverses concentrations a été testée pour son effet *in vitro* sur l'activation de la voie NF-κB dans les cellules humaines. A partir d'une

solution mère de 100 mM, une série de dilutions dans le milieu RPMI a été réalisée pour obtenir des solutions avec des concentrations de 5mM à 90 mM pour cette molécule.

## **Lignées cellulaires**

Deux lignées cellulaires de morphologie épithéliale intestinale ou monocytaire transfectées d'une manière stable avec un gène rapporteur pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (décrites dans l'article 1) ont été utilisées. Ce sont les cellules HT-29/kB-luc-E, un clone de la lignée HT29 transfectées par le gène Luciférase (luc) (Lakhdari et al., 2010) et les cellules THP-1 bleue<sup>TM</sup> contenant le rapporteur NF- $\kappa$ B/SEAP (Invitrogen).

## **Culture cellulaire**

Les cellules HT-29 ont été cultivées dans le milieu RPMI (Sigma) supplémenté avec 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml de pénicilline, 10 $\mu$ g/ml de streptomycine et 10% sérum de veau fœtal (FCS-Lonza) dans une atmosphère humide 5% CO<sub>2</sub> à 37°C. Les cellules THP-1 bleue<sup>TM</sup> ont été utilisées selon le protocole d'instruction défini par Invitrogen.

## **Analyse de l'activation NF- $\kappa$ B**

Pour chaque expérience, les cellules HT-29/kB-luc-E ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits à une hauteur de 50,000 cellules par puits et elles ont été incubées pendant 48h avant l'activation. Les cellules THP-1 bleue<sup>TM</sup> NF- $\kappa$ B/SEAP ont étéensemencées à une hauteur de 10,000 cellules par puits. Les cellules ont été stimulées par 10% vol/vol de surnageants bactériens ou de leurs fractions parallèlement à une stimulation par un activateur de NF- $\kappa$ B (le TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , flagelline ou LPS). Le contrôle utilisé pour chaque expérience était le milieu de culture traité de la même façon que les surnageants et ajusté avec la solution 6N HCL au pH 5.5 correspondant au pH des surnageants en fin de culture. La durée d'activation était de 6h pour les HT-29/kB-luc-E et de 24h pour les THP-1 blue.

L'activité de la luciférase a été révélée avec le kit « Luciferase Assay System » (Promega) ou avec le on glow (Promega®) selon les protocoles d'instruction définis. La quantité a été exprimée en unité relative de luminescence produite: RLU (relative luminescence units). L'activité SEAP dans le surnageant de culture a été révélée par le réactif Quanti-Blue<sup>TM</sup> d'Invitrogen selon le protocole d'instruction défini puis quantifiée par la mesure de DO à 655nm. Les différentes mesures sont réalisées par un lecteur de plaque (Infinite 200, TECAN). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activation de la voie

NF- $\kappa$ B par rapport au contrôle positif (cellules activées par l'activateur NF- $\kappa$ B et additionné du milieu de culture pH 5.5).

### **Viabilité cellulaire : test MTS**

La viabilité cellulaire en présence des solutions de la molécule candidate ou des surnageants bactériens a été évaluée par la mesure de la cytotoxicité des cellules, en utilisant la solution CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous contenant le composé tétrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium, inner salt ; MTS]. Le composé MTS tétrazolium est réduit par les cellules métaboliquement actives (en présence de NADPH ou NADH produit par l'enzyme déshydrogénase) en formazan, un produit coloré soluble dans le milieu de culture cellulaire. 20  $\mu$ l de la solution CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous ont été rajoutés dans chaque puits au 100  $\mu$ l des échantillons, et ceux-ci ont été incubés à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. La quantité de formazan soluble produite par les cellules est obtenue par la mesure de la DO à 490nm qui est proportionnelle au nombre de cellules viables dans la culture.

### **Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  l'écartype de mesure de triplicates d'une des trois expériences réalisées indépendamment. Les données ont été analysées par le test de student's *t* test. Les *p* values sont considérées significatives lorsque  $p < 0.05$ .

## II.2. Mécanisme d'action du composé inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, sécrété par la bactérie commensale *Streptococcus salivarius*

(En préparation)

---

Ghalia Kaci<sup>1</sup>, Joël Doré<sup>2</sup>, S. Dusko Ehrlich<sup>1</sup>, Pierre Renault<sup>1</sup>, Hervé M. Blottière<sup>2†\*</sup> et  
Christine Delorme<sup>1†\*</sup>.

### Résumé

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est un régulateur majeur de la réponse immunitaire et inflammatoire des cellules épithéliales intestinales. Une activation chronique de NF- $\kappa$ B, qui se traduit par une forte expression des gènes et médiateurs pro-inflammatoires, est souvent associée au développement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Dans notre étude de 2011, nous avons montré que le surnageant de culture de la bactérie commensale *Streptococcus salivarius* contient un facteur capable d'inhiber l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les lignées épithéliales intestinales humaines HT-29 et Caco-2. Cette inhibition semble se produire au niveau des étapes intracellulaires de la signalisation NF- $\kappa$ B. L'objectif de cette étude a été de déterminer le ou les mécanisme(s) d'action du facteur sécrété par la bactérie commensale *S. salivarius* sur la cascade de signalisation NF- $\kappa$ B. Nos résultats ont montré que le surnageant de culture de cette bactérie favorise l'accumulation de la forme phosphorylée de l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) du à une diminution de sa dégradation par le protéasome. Nous avons également montré que le surnageant bactérien de *S. salivarius* diminue et retarde la translocation nucléaire des deux sous unités composant NF- $\kappa$ B (p65 et p50). En conclusion, cette étude a permis de décrypter en partie le mécanisme protecteur du surnageant de *S. salivarius* contre l'activation de la réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales.

## Introduction

Les produits de sécrétion de la bactérie commensale *Streptococcus salivarius* contiennent un métabolite capable d'inhiber l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans un modèle de cellules épithéliales intestinales humaines (Kaci et al., 2011a). Cette voie de signalisation joue un rôle majeur dans le développement, le maintien et la progression de plusieurs maladies chroniques. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B contrôle l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus physiologiques, notamment la réponse immunitaire et inflammatoire (Baeuerle and Henkel, 1994; Barnes and Karin, 1997; Smale, 2011; Vallabhapurapu and Karin, 2009), la prolifération, la différenciation, l'adhésion cellulaire, la réponse au stress oxydant (Hayden and Ghosh, 2008) et l'apoptose (Beg and Baltimore, 1996; Foo and Nolan, 1999). Dans l'intestin, il a été montré que NF- $\kappa$ B est le régulateur clef de l'inflammation (Barnes and Karin, 1997) et sa dérégulation est souvent associée aux pathologies inflammatoires chroniques intestinales (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) (Kaser et al., 2010; Neurath et al., 1996). Chez les mammifères la famille NF- $\kappa$ B est composée de cinq membres : RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50) et NF- $\kappa$ B2 (p52). Ces derniers s'associent entre eux pour former différents dimères de transactivation. L'hétérodimère p50/p65 (forme majeure) est séquestré dans le cytoplasme par une protéine inhibitrice de la famille I $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ ). L'activation de la signalisation NF- $\kappa$ B par diverses cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ , active un complexe I $\kappa$ B kinase nommé IKK (inhibitor of  $\kappa$ B kinase) qui va permettre la phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B- $\alpha$  nécessaire à sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Le dimère NF- $\kappa$ B (p50/p65) ainsi libéré, transloque dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles, notamment des gènes impliqués dans l'inflammation (Baeuerle and Baltimore, 1996; Ghosh and Karin, 2002).

Dans l'intestin, la tolérance de l'hôte au microbiote endogène se traduit en partie par le blocage de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par les bactéries de ce microbiote afin de limiter une réponse inflammatoire excessive. Des études récentes ont montré que, non seulement les bactéries entières vivantes, mais aussi leurs métabolites sécrétés, sont capables d'inhiber la voie NF- $\kappa$ B (Yan and Polk, 2010). Certains mécanismes par lesquels les bactéries commensales ou leurs métabolites limitent l'activation de la voie NF- $\kappa$ B ont été nouvellement élucidés. Ces mécanismes d'inhibition ciblent dans la plupart des cas, les étapes clefs de cette

signalisation comme la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$ , la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et sa fixation sur l'ADN.

Nous avons montré que le surnageant de *S. salivarius* inhibait la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules HT-29, Caco-2 et THP-1 activées par des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ ) ou par des protéines membranaires d'origine bactérienne (flagelline, LPS) (Kaci et al., 2011a). Le fait que la molécule sécrétée par *S. salivarius* soit active indépendamment du type cellulaire ou de l'agent pro-inflammatoire utilisé, suggère que sa cible cellulaire est l'une des étapes intracellulaires de la cascade de signalisation NF- $\kappa$ B et non un récepteur spécifique. L'objectif de ce travail a consisté à (i) identifier la ou les cible(s) cellulaire(s) de la molécule anti-inflammatoire sécrétée par la bactérie commensale *S. salivarius* et (ii) comprendre le ou les mécanisme(s) d'action de cette molécule sur la voie NF- $\kappa$ B.

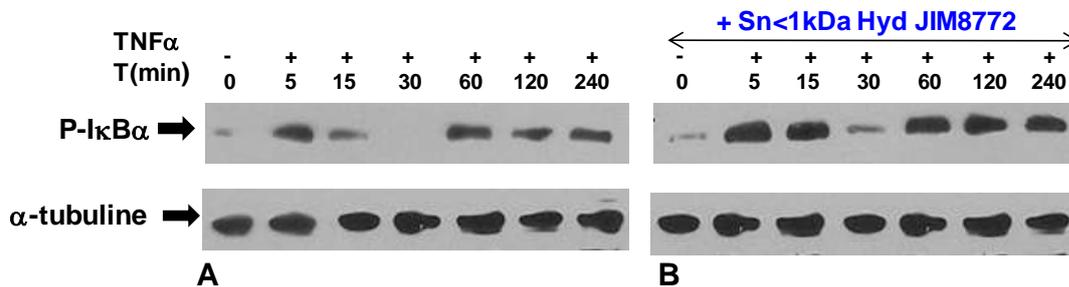
## Résultats

L'effet inhibiteur des surnageants de *S. salivarius* sur l'activation NF- $\kappa$ B étant retrouvé indépendamment du type de stimuli appliqué aux cellules et de lignée la cellulaire utilisée, suggère que la cible de la molécule inhibitrice est intracellulaire. Ainsi, nous avons dans un premier temps recherché un effet au niveau des étapes de la phosphorylation et de la dégradation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ , puis nous avons examiné l'étape de la translocation du facteur NF- $\kappa$ B dans le noyau.

### 1. Effet du surnageant de *S. salivarius* sur la phosphorylation d'I $\kappa$ B

#### a. Cinétique de la phosphorylation d'I $\kappa$ B

Dans un premier temps la cinétique de phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  après l'induction de la voie NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$  a été étudiée. Des extraits de protéiques cytoplasmiques des cellules HT-29 parentales activées à différents temps (5 min- 4h) par le TNF- $\alpha$  ont été analysés par Western Blot, la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylée a été détectée par un anticorps spécifique dirigé contre les sites de phosphorylation (Ser 32/36).



**Figure 1 : Effet du surnageant de *S. salivarius* sur la phosphorylation de la protéine I $\kappa$ B.** 20 $\mu$ g de protéines cytoplasmiques des cellules HT-29 parentales stimulées à différents temps avec le TNF $\alpha$  en présence ou en absence du surnageant de culture de la souche JIM8772 sont séparées par SDS-PAGE (12% d'acrylamide). Les protéines phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  et  $\alpha$ -tubuline sont révélées avec des anticorps spécifiques. **A** : Cinétique de phosphorylation de la protéine I $\kappa$ B après induction de NF- $\kappa$ B par le TNF $\alpha$  seul. **B** : Cinétique phosphorylation de la protéine I $\kappa$ B après activation de NF- $\kappa$ B avec le TNF $\alpha$  en présence de la fraction surnageant hydrophile de la souche JIM8772 (Sn<1 kDaHyd JIM8772).

Comme le montre la **Figure 1A**, la protéine I $\kappa$ B est phosphorylée très tôt, dès 5 min après l'induction de NF- $\kappa$ B par le TNF $\alpha$ . Cette phosphorylation diminue et disparaît à partir de 15 min, pour réapparaître au bout d'une heure et rester stable. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation rapide d'I $\kappa$ B $\alpha$  est transitoire dans la cellule, et que ce facteur est rapidement dégradé par le protéasome. La réapparition de la forme phosphorylée qui persiste est due à l'activation cyclique de NF- $\kappa$ B en présence d'un stimuli continue.

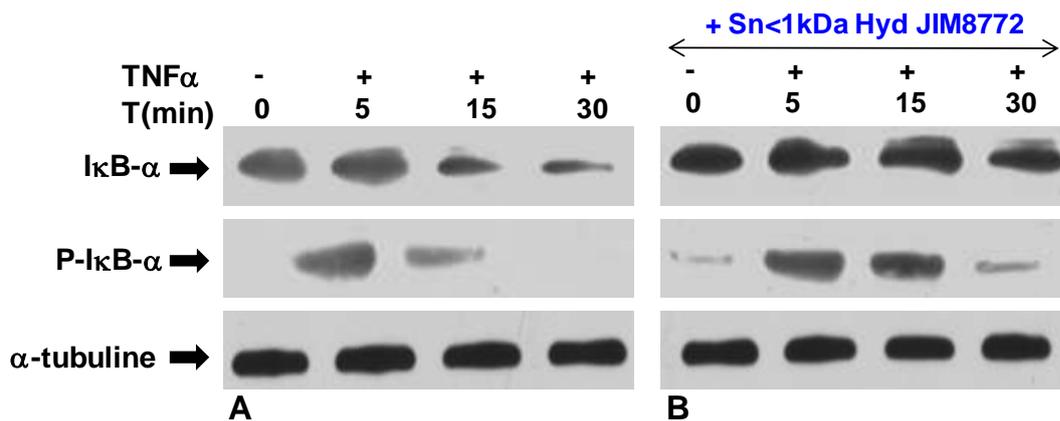
### ***b. Accumulation de IκB phosphorylé en présence de surnageant de S. salivarius***

La phosphorylation d'IκBα a été analysée en présence du surnageant de culture de *S. salivarius*. Les lysats cytoplasmiques des cellules HT-29 stimulées à différents temps par le TNFα en présence de la fraction surnageant < 1 kDa hydrophile de la souche JIM8772 ont été séparés sur un gel SDS-PAGE, puis la forme phosphorylée de protéine IκBα a été révélée avec des anticorps spécifiques.

Les résultats de la **Figure 1B** montrent que la présence de la fraction hydrophile du surnageant de la souche JIM8772 augmente la phosphorylation précoce de la protéine IκBα et que cette forme phosphorylée persiste plus longtemps dans la cellule. Ces observations suggèrent que le métabolite synthétisé par *S. salivarius* favorise l'accumulation d'IκBα phosphorylée dans la cellule.

## **2. Le surnageant de *S. salivarius* inhibe la dégradation d'IκBα**

Pour approfondir les observations précédentes, la forme non phosphorylée de la protéine IκBα a été étudiée. Les protéines cytoplasmiques étudiées dans l'expérience précédente ont été analysées par Western Blot avec des anticorps dirigés contre IκBα non phosphorylée. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de l'analyse de la forme phosphorylée de cette protéine.

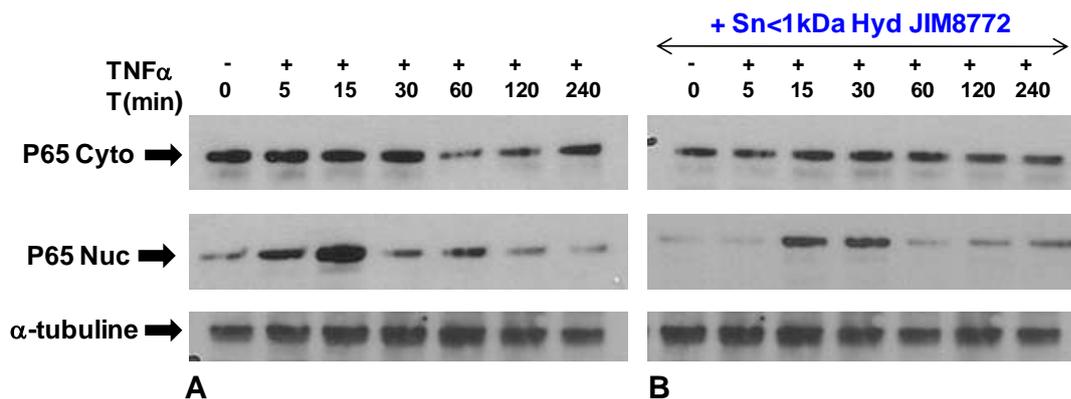


**Figure 2 : Le surnageant de *S. salivarius* inhibe la dégradation de l'inhibiteur IκB après activation de NF-κB.** Les lysats cytoplasmiques (20μg) préparés à partir des cellules HT-29 parentales activées avec le TNFα sont séparés par SDS-PAGE (12% d'acrylamide) et détectés avec des anticorps dirigés contre les protéines: phospho-IκBα, IκBα et α-tubuline. **A** : Extraits protéiques des échantillons témoins activés uniquement avec le TNFα. **B** : Extraits protéiques des échantillons co-activés avec le TNFα et la fraction surnageant hydrophile de la souche JIM8772 (Sn<1 kDa Hyd JIM8772).

Les résultats illustrés par la **Figure 2A** indiquent qu'en absence d'activation par le TNF- $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$  est sous forme non phosphorylée et que sa quantité diminue de façon importante dans les lysats à partir de 15 min après l'induction de la voie NF- $\kappa$ B. Cette diminution est corrélée avec la disparition de sa forme phosphorylée dans la cellule qui est dégradée par le protéasome. En revanche, à ces mêmes temps, la quantité d'I $\kappa$ B $\alpha$  reste constant en présence de la fraction hydrophile du surnageant bactérien (**Figure 2B**). Ces résultats sont corrélés avec l'accumulation et la persistance de la forme phosphorylée dans la cellule qui n'est pas dégradée. Ces résultats suggèrent que le métabolite bactérien présent dans le surnageant de *S. salivarius* exerce un effet inhibiteur sur la voie NF- $\kappa$ B en favorisant la séquestration du facteur NF- $\kappa$ B par son inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . Il bloque soit directement les étapes de la dégradation d'I $\kappa$ B phosphorylé, soit l'activité du protéasome.

### 3. La translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B est diminuée en présence de surnageant de *S. salivarius*

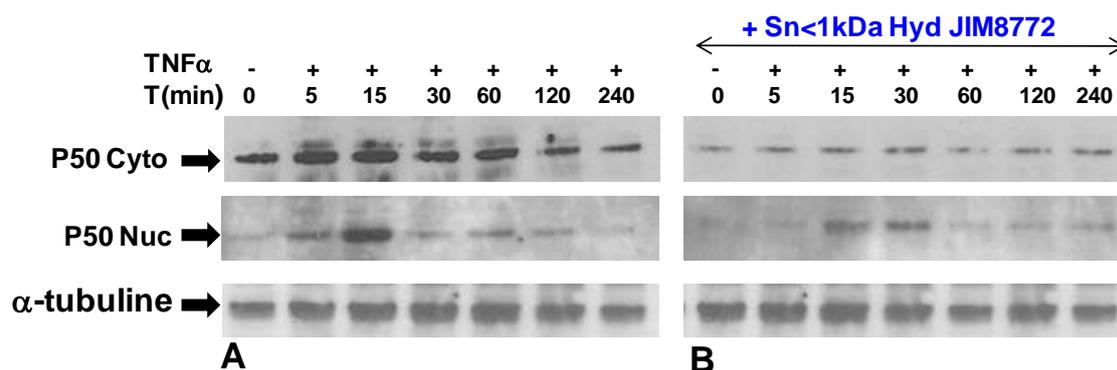
La localisation cellulaire du facteur transcription NF- $\kappa$ B a été analysée pour confirmer l'hypothèse que ce dernier reste séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  lorsque les cellules sont activées en présence du surnageant bactérien. Les deux sous-unités NF- $\kappa$ B-p65 et NF- $\kappa$ B-p50 composant le facteur NF- $\kappa$ B ont été identifiées dans les extraits nucléaires et cytoplasmiques des cellules HT-29 stimulées par le TNF- $\alpha$  aux différents temps indiqués. L'analyse de la sous-unité NF- $\kappa$ B-p65 a été réalisée trois fois.



**Figure 3 : Inhibition de la translocation nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B par le surnageant de *S. salivarius*.** Des extraits cytoplasmique et nucléaire (20 $\mu$ g) préparés à partir des cellules HT-29 parentales à différents temps indiqués sont séparés par SDS-PAGE et analysés par Western blot avec des anticorps anti NF- $\kappa$ B-p65. **A** : Extraits des cellules HT-29 activés uniquement avec le TNF $\alpha$ (témoins). **B** : Extraits des cellules HT-29 stimulées par le TNF $\alpha$  en présence de la fraction surnageant hydrophile de la souche JIM8772 (Sn < 1kDa Hyd JIM8772). Cyto: Cytoplasme, Nuc: Nucléaire.

La **Figure 3A** montre qu'après induction par le TNF- $\alpha$ , le niveau de la sous-unité p65 dans le cytoplasme reste inchangé pendant 30 min. A partir de 60 min, ce niveau diminue pour revenir à la quantité basale au bout de 4h. Dans le noyau, dès 5 min après l'activation, la quantité de la sous-unité p65 augmente. Ces observations montrent que cette sous-unité a majoritairement une localisation cytoplasmique et qu'elle transloque dans le noyau dès 5 min après activation de la voie NF- $\kappa$ B. Ces résultats confirment notre précédente analyse sur une phosphorylation rapide (5 min) suivie d'une dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et celle de la littérature montrant que la dégradation rapide de cet inhibiteur phosphorylé libère le facteur NF- $\kappa$ B (Ghosh and Karin, 2002) qui est ainsi capable de transloquer dans le noyau. En présence du surnageant de *S. salivarius* (**Figure 3B**), la quantité de la sous-unité p65 détectée dans le cytoplasme est plus faible que celle observée en absence du surnageant. De plus l'apparition de cette sous-unité dans le noyau n'est observable qu'à partir de 15 min avec une quantité fortement diminuée comparée au même échantillon en absence du surnageant. Ces résultats indiquent qu'en présence du surnageant bactérien la quantité de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B est diminuée dans les deux fractions, même en absence d'activation, et que la translocation nucléaire est retardée. Pour confirmer cette hypothèse, il sera nécessaire de compléter cette expérience avec un témoin interne de quantification des protéines nucléaires.

La seconde sous-unité NF- $\kappa$ B-p50 a été également étudiée et analysée dans des conditions similaires à la sous-unité p65 et les résultats obtenus sont illustrés par la **Figure 4**. Cette expérience a été réalisée deux fois.



**Figure 4 : Effet du surnageant de *S. salivarius* sur la sous unité p50 de NF- $\kappa$ B.** Des extraits cytoplasmique et nucléaire (20 $\mu$ g) des cellules HT-29 parentales séparés par SDS-PAGE sont analysés par Western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine NF- $\kappa$ B-p50. **A:** Extraits des cellules HT-29 activées à différents temps avec le TNF $\alpha$ (témoins). **B:** Extraits des cellules HT-29 activées par le TNF $\alpha$  en présence de la fraction surnageant hydrophile de la souche JIM8772 (Sn Hyd JIM8772). Cyto: Cytoplasme, Nuc: Nucléaire.

De la même façon que pour p65, en absence d'activation, la sous-unité p50 a majoritairement une localisation cytoplasmique. Dès 5 min après l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, cette protéine est détectée dans le noyau. On observe également qu'en présence du surnageant bactérien la quantité de p50 dans le cytoplasme est fortement diminuée et sa localisation nucléaire est retardée, et en quantité moindre. Ces résultats suggèrent qu'en présence du surnageant bactérien la quantité de la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B est diminuée dans les deux fractions, même en absence d'activation, et que la translocation nucléaire est retardée. De la même façon que pour les expériences avec la sous-unité p65, il faudra vérifier que les quantités de protéines déposées sont identiques pour tous les extraits nucléaires testés. Ainsi, les deux sous-unités NF- $\kappa$ B (p65 et p50) se comportent de la même façon dans le cytoplasme et le noyau. Le métabolite bactérien présent dans le surnageant diminue la quantité du facteur NF- $\kappa$ B dans les deux compartiments et retarde la translocation dans le noyau.

## Discussion

Les effets anti-inflammatoires exercés par certaines bactéries commensales et probiotiques sur les voies impliquées dans la réponse inflammatoire intestinale, notamment la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, ont été largement étudiés *in vitro* sur des lignées cellulaires. Certains travaux ont permis d'élucider partiellement les mécanismes et les cibles cellulaires des effets anti-inflammatoires exercés par ces bactéries mais sans aller jusqu'à l'identification précise de l'effecteur microbien. Parmi les principaux mécanismes conduisant à une inhibition de la signalisation NF- $\kappa$ B décrit dans la littérature on retrouve l'induction de l'export nucléaire de la sous unité NF- $\kappa$ B-p65 *via* le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  par *Bacteroides thetaiotaomicron* (Kelly et al., 2004), l'inhibition de la translocation dans le noyau de p65 suite à une diminution de l'activité ubiquitine/protéasome impliquée dans la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Neish et al., 2000; Petrof et al., 2004a; Tien et al., 2006), et enfin, le blocage de la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  par certaines souches probiotiques (Heuvelin et al., 2009; Santos Rocha et al., 2011).

Dans notre étude, le mécanisme d'action et la cible intracellulaire du métabolite bactérien de *S. salivarius*, inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, ont été étudiés dans les cellules épithéliales intestinales HT-29. L'induction de la voie NF- $\kappa$ B par le TNF $\alpha$  a montré une phosphorylation rapide (après 5 min) d'I $\kappa$ B $\alpha$ , la protéine séquestrant à l'état inactif le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Après 15 min, on observe une réduction de la phosphorylation de cette protéine ainsi qu'une diminution de la quantité d'I $\kappa$ B $\alpha$  (l'anticorps anti-I $\kappa$ B $\alpha$  détecte la protéine totale) qui correspond à la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylé par le système ubiquitine/protéasome, une étape nécessaire à la libération du facteur NF- $\kappa$ B. Par la suite, nous avons observé que le dimère NF- $\kappa$ B ainsi libéré transloque dans le noyau dès 5 min après activation. Ces résultats viennent confirmer ceux reportés par Ghosh et collaborateurs; et Gilmore (Ghosh and Karin, 2002; Gilmore, 2006), mais en revanche sont, en désaccord avec des travaux de Jobin et al., qui montraient l'accumulation et la non dégradation de la protéine I $\kappa$ B phosphorylée dans les cellules HT-29 (Jobin et al., 1997).

Nos résultats suggèrent/ou confirment que la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  est un évènement transitoire et rapide dans la cellule. La réapparition de la forme I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylée qui persiste dans le temps s'explique par l'amplification du signal d'activation de NF- $\kappa$ B et le renouvellement d'I $\kappa$ B $\alpha$  en présence d'un stimuli continu (Russo et al., 2004).

L'étude de l'effet du composé de *S. salivarius* sur cette étape de la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  a montré que la fraction surnageant hydrophile de la souche JIM8772 n'affecte pas directement la phosphorylation de cette protéine, mais favorise son accumulation dans les cellules, probablement en bloquant sa dégradation par le protéasome. Cette étape critique de la cascade pro-inflammatoire met en jeu l'ubiquitination d'I $\kappa$ B $\alpha$  et la protéolyse par les enzymes du protéasome. Ainsi, un large panel de molécules comme les ubiquitines, les ligases et autres protéines dont l'activité est liée au protéasome, reste à tester.

La présence de la fraction hydrophile du surnageant de *S. salivarius* diminue la quantité cytoplasmique et nucléaire des deux sous unités formant le dimère actif NF- $\kappa$ B (p65/p50), et retarde leur translocation dans le noyau. Ces observations concordent avec l'inhibition de la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Elles confirment que le métabolite bactérien maintient la séquestration du facteur NF- $\kappa$ B par son inhibiteur, ce qui réduit et retarde sa translocation dans le noyau. En présence du surnageant bactérien (+/- TNF- $\alpha$ ), la diminution du taux de p65 et p50 observée dans les fractions cytoplasmiques pourrait s'expliquer par un défaut de stabilité du facteur NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme mais qui reste à confirmer.

Un tel mécanisme d'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B a été décrit chez des cellules épithéliales intestinales en interaction avec des bactéries commensales comme *Salmonella enteritidis* (non pathogène) qui inhibe l'ubiquitination et la dégradation de la protéine inhibitrice de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), et diminue par conséquent la translocation nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B (Neish et al., 2000). Egalement, les espèces réactives de l'oxygène générées par les cellules épithéliales intestinales en présence de la bactérie commensale *Bacteroides thetaiotaomicron* ou le probiotique *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) inhibent la neddylation de la cullin-1, une des sous-unités régulatrice de l'ubiquitine-ligase. Ceci conduit à un défaut d'ubiquitination d'I $\kappa$ B $\alpha$  et de dégradation par le protéasome (Kumar et al., 2007).

Les résultats de cette étude ont permis de décrypter partiellement les mécanismes de l'effet immunomodulateur exercé par le surnageant de la bactérie commensale *S. salivarius* sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Un ou plusieurs métabolites bactériens présents dans le surnageant de culture de cette bactérie interfère avec la dégradation de l'I $\kappa$ B $\alpha$  par le protéasome et par conséquent maintiennent la séquestration du facteur NF- $\kappa$ B dans le compartiment cytoplasmique. Ainsi, la quantité de la forme libre de NF- $\kappa$ B capable de transloquer dans le noyau est diminuée et perturbe l'activation de l'expression des gènes de l'inflammation.

## Matériels et Méthodes

### Culture cellulaire

La lignée cellulaire parentale HT-29 de l'épithélium intestinal utilisée est cultivée en RPMI (Sigma) supplémenté avec 2mM L-glutamine, 100 IU/ml de pénicilline, 10µg/ml de streptomycine et 10% de sérum de veau fœtale inactivé par la chaleur (FCS- Lonza) dans une atmosphère humide 5% CO<sub>2</sub> à 37°C. Les cellules HT29 sontensemencées dans une plaque de 6 puits à hauteur de 2.10<sup>6</sup> cellules par puits. Après 48h d'incubation à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules sont mises en présence de la fraction <1 kDa hydrophile du surnageant bactérien (10% vol/vol) parallèlement à une stimulation par le TNFα (10ng/ml) pendant différents temps (0 min à 4h).

### Culture bactérienne et préparation des fractions surnageants

La souche commensale de *S. salivarius* JIM8772 (isolée de la cavité buccale) a été cultivée sur un milieu MCD complet (milieu chimiquement définie) supplémenté avec 1% de glucose à 37°C pendant toute la nuit (Kaci et al., 2011a). La fraction surnageant hydrophile est obtenue suite à des purifications sur des filtres moléculaires et une colonne d'hydrophobicité Sep-Pak plus tC18 (Résultats-3).

### Préparation des fractions cellulaires

Les cellules HT-29 stimulées par le TNF-α en présence ou non du surnageant bactérien ont été prélevées à différents temps pour l'extraction des protéines cytoplasmique et nucléaire (toutes les étapes d'extraction ont été réalisées à 4°C). Brièvement, le milieu est aspiré, le tapis de cellule est rincé deux fois avec une solution PBS contenant des inhibiteurs de phosphatase, puis décollé délicatement. La suspension de cellules est resuspendue dans 2 ml de la solution PBS/inhibiteur phosphatase puis centrifugées 5 min à 500 rpm afin de récupérer le culot cellulaire pour l'extraction des protéines.

#### *a- Extraction de protéines cytoplasmiques*

Les cellules sont lysées avec 500µl du tampon hypotonique (25 Mm HEPES pH 8, 5 mM KCL, 1Mm DTT, 0.5 Mm MgCl<sub>2</sub>) pendant 15 min. Après l'ajout de 25 µl du détergent, le lysat cellulaire est centrifugé 1min à 14.000g, le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est récupéré et le culot est utilisé pour l'extraction de protéines nucléaires.

*b- Extraction de protéines nucléaires*

Le culot de noyau est incubé dans 100µl de la solution un tampon de lyse complet (Complete Lysis Buffer : 10 mM DTT, Lysis Buffer AM1, Protease inhibitor Cocktail) pendant 30 min sous agitation à 150 rpm. Ensuite, la suspension est centrifugée 10 min à 14.000g pour aliquoter les protéines nucléaires présentes dans le surnageant. Les lysats cytoplasmiques et nucléaires sont congelés à -80°C.

*c- Dosage des protéines*

Les protéines des différentes fractions cellulaires (cytoplasmique et nucléaire) sont dosées à l'aide du Nano droppe étalonné (blanc) avec les tampons de lyse utilisés pour l'extraction. Le programme de dosage consiste en une mesure de l'absorbance à 280 nm (dosage protéines A280) qui est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans chaque échantillon.

## **Analyse par Western Blot**

Les lysats cellulaires sont dénaturés par chauffage en présence du tampon de Laemmli1X+ DTT 0.1M. 20µg de protéines (cytoplasmique et nucléaire) sont séparés sur un gel SDS-PAGE (12% d'acrylamide). Les protéines sont transférées (transfert semi sec) sur une membrane de PVDF (porosité 0,45µm, Immobilon-P, MILLIPORE, USA). Cette dernière saturée en protéines pendant une heure dans une solution de lait à 5% est incubée toute la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire : rabbit polyclonal anti-IκBα (1µg/ml ; Santa Cruz), mouse monoclonal anti-phospho IκBα (Ser32/36) (1/200 ; Cell Signaling), souris monoclonale anti NF-κB-p65 (1/1000 ; Santa Cruz), rabbit polyclonal anti NF-κB-p50 (1/500 ; Santa Cruz) ou mouse anti-α tubuline (0.5 mg/ml; Zymed). La membrane lavée puis incubée une heure avec les anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase (HRP), est révélée en présence du substrat de la peroxydase (Kit ECL West pico ou West DURA, Pierce).

- Masse moléculaire des protéines étudiées : NF-κB-p65 (65 kDa), NF-κB-p50 (50 kDa), αtubuline (50 kDa), IκB-α (37 kDa) et phospho IκBα (40 kDa).

# *Discussions*

## Discussion et perspectives

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant de la communauté scientifique pour identifier et pour étudier des espèces bactériennes commensales présentant des effets bénéfiques pour le traitement de pathologies humaines de type infectieux et inflammatoire. Des effets de ces bactéries ont été démontrés, entre autre, sur la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et la régulation de la réponse inflammatoire intestinale. De nombreuses données expérimentales *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, ainsi que certains essais cliniques chez l'homme, ont montré clairement des effets anti-inflammatoires de probiotiques et de bactéries commensales. Certains essais cliniques ont montré que des probiotiques réduisaient l'incidence et la sévérité d'entéocolites nécrosantes chez le nourrisson (Franks, 2010), le risque de cancer colorectal (Fotiadis et al., 2008) et les symptômes associés au syndrome du côlon irritable (Aragon et al., 2010).

Les mécanismes d'action de ces micro-organismes restent encore mal connus et sont pour la plupart probablement complexes. Les études actuelles suggèrent que ces effets reposeraient essentiellement sur des interactions entre ces bactéries (probiotiques et commensales), les cellules épithéliales et le système immunitaire muqueux. L'épithélium intestinal contrôle plusieurs fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie. Son dysfonctionnement peut entraîner le développement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). La cellule épithéliale intestinale est le premier type cellulaire à entrer en contact avec le contenu luminal. Elle constitue donc une cible intéressante pour initier un retour vers un état « non-inflammatoire » en présence de bactéries commensales bénéfiques.

Si les effets protecteurs des bactéries dans le contexte des MICI sont plutôt bien démontrés avec différentes souches de bifides et de lactobacilles, peu d'effets ont été décrits chez les streptocoques. Ce groupe rassemble à la fois des espèces pathogènes, commensales et alimentaires. Depuis quelques années, plusieurs études ont rapportés des propriétés immunomodulatrices de certaines souches appartenant au groupe *salivarius* (Cosseau et al., 2008; Menard et al., 2004; Tooley et al., 2011). Ce dernier est composé de trois espèces isolées de niches écologiques différentes mais qui sont phylogénétiquement proches. Il contient des bactéries alimentaires (*Streptococcus thermophilus*) et des bactéries commensales du microbiote humain (*S. salivarius* et *S. vestibularis*) (Facklam, 2002).

*Streptococcus salivarius* est l'une des premières espèces commensales qui s'implante dans la cavité buccale et représente l'une des bactéries dominantes de ce

microbiote (Kononen et al., 2002). Elle est aussi présente en sous dominance dans le tractus digestif (biopsies gastriques de l'estomac et du jéjunum) avec des concentrations dans les fèces de  $10^5$ - $10^8$  CFU/g (données MetaHIT) (Hakalehto et al., 2011a; Park et al., 2005). Cette bactérie, retrouvée en contact avec la muqueuse épithéliale buccale, a de nombreuses interactions dans son écosystème. Des travaux en écologie buccale montrent le rôle de *S. salivarius* dans (i) la protection contre la colonisation des pathogènes impliqués dans des périodontites (Tanzer et al., 1985; Teughels et al., 2007a; Teughels et al., 2007b), (ii) l'inhibition *in vitro* de la prolifération de *Candidat albicans* (Zhang et al., 2011) et (iii) la production de bactériocines avec un rôle antagoniste sur les streptocoques virulents (*Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus pneumoniae*) (Birri et al., 2012; Santagati et al., 2012a; Walls et al., 2003). En plus de son rôle dans l'équilibre du microbiote buccal, il a été montré que les souches TOVE, PZ86 et K12 jouent également un rôle important dans la réduction de la réponse inflammatoire induite par un pathogène (Frick et al., 2007a; Frick et al., 2007b; Mostefaoui et al., 2004; Sliepen et al., 2009a). Actuellement, la souche de *S. salivarius* K12, est utilisée comme "probiotique" en protection buccale pour restaurer la balance de la flore microbienne dans les cas d'halitose et de prévenir les pharyngites bactériennes dues à *S. pyogenes* (Burton et al., 2011b; Wescombe et al., 2006). L'implantation naturelle et la persistance de *S. salivarius* dans le tractus digestif, ainsi que ces propriétés antagonistes soulèvent des questions sur le type de réponse cellulaire mis en place lors du dialogue entre la bactérie et l'hôte. De plus, en réponse à une stimulation par la souche K12, les cellules épithéliales modulent la transcription des gènes impliqués dans la réponse immunitaire tels que ceux régulés par NF- $\kappa$ B. Ceci suggère ainsi un rôle dans l'homéostasie avec l'hôte (Cosseau et al., 2008).

Les effets immunomodulateurs sur la signalisation NF- $\kappa$ B, ont été largement étudiés dans des lignées épithéliales intestinales. NF- $\kappa$ B est le régulateur clef de diverses réponses intestinales en particulier l'inflammation qui module l'expression des gènes et médiateurs pro-inflammatoires (Barnes and Karin, 1997; Smale, 2011). Sa dérégulation est souvent associée à des pathologies inflammatoires chroniques comme la maladie de Crohn et les rectocolites hémorragiques (Kaser et al., 2010; Neurath et al., 1996).

Une étude préliminaire réalisée au sein de l'équipe « Fonctionnalité de l'écosystème intestinal » de l'unité Micalis, visant à évaluer le potentiel de diverses souches commensales du microbiote sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, a montré qu'une souche de l'espèce *Streptococcus vestibularis* inhibait fortement l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules

testées. A partir d'une collection de souches de l'équipe « Bactéries Alimentaires et Commensales », nous avons évalué *in vitro* l'effet d'une quarantaine de souches de *S. salivarius* et *S. vestibularis* sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Focalisant nos travaux sur les souches les plus actives (JIM8772 et CIP102503T), nous avons montré qu'à la fois, les surnageants de culture et les bactéries entières vivantes, étaient capables de réprimer la voie NF- $\kappa$ B activée (Kaci et al., 2011a). Nous avons (i) confirmé *in vivo* les propriétés immunomodulatrices des souches testées sur un modèle murin présentant une inflammation digestive de type colite, induite au TNBS (Kaci et al., soumis) et (ii) identifié *in vitro* les mécanismes utilisés par *S. salivarius* pour moduler la réponse inflammatoire des cellules épithéliales. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'identification et à la caractérisation de cette (ou ces) molécule(s) au potentiel anti-inflammatoire.

## I. Propriétés anti-inflammatoires de *S. salivarius*

L'évaluation des effets anti-inflammatoires d'une souche donnée repose généralement sur la capacité de cette dernière à diminuer la production et la sécrétion des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par des cellules épithéliales et immunitaires. Les études basées sur l'utilisation des outils moléculaires de type dosage ELISA, QRT PCR limitent généralement le nombre de souches à étudier. Dans notre étude, nous avons utilisé une approche originale basée sur des modèles cellulaires dotés de systèmes rapporteurs pour identifier des souches commensales capables de contrôler la réponse inflammatoire de l'hôte. Les modèles développés par l'équipe d'Hervé Blottière contiennent des gènes rapporteurs sous contrôle du facteur de transcriptions NF- $\kappa$ B, qui a un rôle déterminant dans l'inflammation intestinale. Plusieurs lignées de cellules épithéliales intestinales (HT-29), du côlon (Caco-2) ou encore du sang (THP-1) ont été transfectées par des systèmes rapporteurs stables (luciférase, SEAP; Phosphatase Alcaline Secrété) pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B ont été utilisées pour cribler les banques de clones métagénomiques provenant du tractus digestif humain et à identifier des clones modulateurs de l'activation de cette voie (Lakhdari et al., 2010). Nous avons utilisé ces modèles rapporteurs NF- $\kappa$ B pour évaluer le potentiel anti-inflammatoires de 9 souches de *S. vestibularis* et 32 souches de *S. salivarius*, disponibles dans notre collection. Nous avons mis en évidence un potentiel inhibiteur des surnageants de culture de toutes les souches testées sur l'activation NF- $\kappa$ B par la cytokine pro-inflammatoire le TNF $\alpha$ . Cette approche a été également utilisé avec succès pour identifier d'autres bactéries

modulatrices de la voie NF- $\kappa$ B comme des commensales intestinales humaines et des bactéries lactiques comme *Lactobacillus delbruckii*, (Lakhdari et al., 2011; Santos Rocha et al., 2011). Jusqu'à présent, peu d'études utilisant ce type d'outil pour cribler à haut débit des collections bactériennes et d'identifier des souches, ou des activités microbiennes capables d'interagir avec l'hôte, ont été décrites dans la littérature.

De nombreuses études expérimentales portant sur l'efficacité des probiotiques ont mis en évidence des différences en fonction des espèces et des souches bactériennes utilisées. Dans ce travail, nous avons constaté pour chacune des souches testées un niveau d'inhibition compris entre 30% et 70%, ce qui montre que les deux espèces buccales (*S. vestibularis* ou *S. salivarius*) possèdent des capacités anti-inflammatoires souche dépendante. Le fait que les effets anti-inflammatoires soient souches spécifiques a été rapporté dans d'autres études (Heuvelin et al., 2009; Petrof et al., 2009; Santos Rocha et al., 2011). L'évaluation des capacités protectrices des souches intestinales sur l'inflammation est intéressant pour le choix des souches à utiliser pour une future application thérapeutique. Pour les bactéries du groupe salivarius, la spécificité de cet effet aux souches buccales par rapport aux souches provenant du microbiote intestinal, n'a pas été approfondie. Il serait également intéressant d'élargir cette étude à l'espèce *S. thermophilus* qui fait partie de ce groupe, mais est une bactérie alimentaire. La gamme d'inhibition et l'effet souche observé, pourraient s'expliquer par des différences de production ou de sécrétion du produit actif par chaque souche puisque nous avons montré que l'inhibition est aussi dose dépendante. Le dosage de la molécule candidate dans les surnageants des souches présentant divers taux d'inhibition pourrait répondre à cette question.

Dans des conditions inflammatoires, la répression de l'activation NF- $\kappa$ B conduit logiquement à une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires par les cellules. Au niveau de la muqueuse intestinale, cela limite le recrutement des cellules immunitaires et diminue l'amplification des réponses immunitaires. Elle protège en conséquence les tissus épithéliaux des lésions causées par l'inflammation. Plusieurs bactéries du microbiote au potentiel anti-inflammatoire *via* l'inhibition de l'induction d'IL-8 ont été décrites dans la littérature. Les produits de sécrétion de *F. prausnitzii*, de *B. breve* C50 ainsi que plusieurs souches probiotiques de lactobacilles et de bifides répriment la production d'IL-8 induite par un signal pro-inflammatoire ou par *Salmonella typhimurium* dans les cellules intestinales (Heuvelin et al., 2009; Ma et al., 2004; Neish et al., 2000; O'Hara and Shanahan, 2006; Sokol et al., 2008; Zhang et al., 2005). Focalisant nos travaux sur les deux souches les plus actives (JIM8772, CIP102503T) nous avons montré que les surnageants de ces souches

réduisaient la quantité d'IL-8 produite par les cellules HT-29 activées par le TNF- $\alpha$ . Ces résultats confirment le potentiel anti-inflammatoire de *S. salivarius*. Il a été montré que les probiotiques *L. casei*, *L. bulgaricus* et *B. longum* diminuent la sécrétion d'IL-8 sur des explants intestinaux de patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique après co-culture (Bai et al., 2006; Llopis et al., 2009). Chez ces patients, il est aussi possible d'envisager l'utilisation de *S. salivarius* ou ses produits de sécrétions pour diminuer voir réprimer l'inflammation excessive.

Nous avons également montré que l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B n'est pas spécifique aux produits de sécrétion. Les bactéries vivantes, à la différence des bactéries tuées par la chaleur, répriment l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Nous avons aussi constaté que l'effet inhibiteur des surnageants augmentait pendant la croissance bactérienne pour atteindre un maximum en phase stationnaire. Ces résultats indiquent une production et une sécrétion de composés solubles aux propriétés anti-inflammatoires qui s'accumule pendant la croissance de la bactérie. Cela suggère que le dialogue entre *S. salivarius* et son hôte ne nécessite pas un contact direct avec les cellules épithéliales, et que le métabolite sécrété est suffisant pour réduire l'activation excessive de NF- $\kappa$ B. Des métabolites bactériens sécrétés, présentant un effet inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B ont été précédemment décrits chez des bactéries lactiques, notamment *Bifidobacterium breve* C50 (Heuvelin et al., 2009; Menard et al., 2004), chez les probiotiques *Lactobacillus plantarum* (Petrof et al., 2009) et *Saccharomyces boulardii* (Sougioultzis et al., 2006) ou également chez la bactérie commensale comme *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol et al., 2008). Le surnageant de culture de cette bactérie dominante du microbiote intestinal inhibe l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules Caco-2 stimulées par de l'IL-1 $\beta$ . Récemment une autre étude a également montré que les surnageants d'autres bactéries commensales isolées du tractus digestif humain: *Eubacterium rectale*, *Clostridium nexile* 96/2, *Clostridium leptum*, *Blautiacoccoides*, et *Bacteroides vulgatus*, réduisent l'activation de NF- $\kappa$ B induite par IL-1 $\beta$  dans les cellules Caco-2 (Lakhdari et al., 2011). Pour l'instant, aucun composé n'a été caractérisé dans les études citées précédemment.

## **II. Caractérisation de la molécule aux propriétés anti-inflammatoires sécrétée par *S. salivarius***

De nombreuses études ont mis en évidence *in vitro* et *in vivo* des capacités anti-inflammatoires des métabolites solubles sécrétés dans les surnageants de culture des bactéries

commensales et probiotiques (Heuvelin et al., 2009; Menard et al., 2004; Petrof et al., 2009; Sougioultzis et al., 2006). Les caractéristiques et la nature exacte de ces métabolites restent inconnues pour la plupart de ces études. Dans nos travaux, nous avons identifié et caractérisé un métabolite candidat avec des propriétés anti-inflammatoires, sécrété dans les surnageants de culture de *S. salivarius* vivante. La détection de son activité uniquement avec des bactéries métaboliquement actives suggère que ce dernier n'est pas un composé de structure bactérienne comme l'ADN, les protéines de surface ou d'autres composants de la paroi. Nous avons montré aussi que ce métabolite est différent de l'acide lactique et des autres acides organiques à chaînes courtes produit par *S. salivarius*. Nos résultats publiés en 2011 ont suggérés la présence d'un composé de nature peptidique puisque il est sensible à la présence de la trypsine. Celui-ci est hydrophile et de masse moléculaire inférieure à 1 kDa. L'analyse par HPLC a montré des résultats inattendus et a permis d'identifier une molécule de nature non peptidique. Son identité ne peut être présentée ici parce qu'une étude de faisabilité est en cours. La molécule correspondante synthétisée chimiquement et analysée par HPLC présente des propriétés et caractéristiques identiques à la molécule candidate identifiée dans les surnageants bactériens. L'utilisation de 2-6 mM de ce métabolite miment *in vitro* l'effet inhibiteur des surnageants sur l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales (HT-29) et monocytaires (THP-1). Ces résultats renforcent l'hypothèse que la molécule active serait bien celle identifiée.

Afin de relier les capacités protectrices de *S. salivarius* à la présence exclusive de ce métabolite, il est important de quantifier ce dernier dans les surnageants d'un certain nombre de souches sauvages du groupe salivarius et de mutants invalidés pour sa biosynthèse ou sa sécrétion, puis comparer les effets anti-inflammatoires de ces surnageants. L'évidence d'une corrélation entre la quantité de la molécule produite et l'effet protecteur pourrait dans le futur être utilisée pour développer une approche efficace de criblage des bactéries immunomodulatrices.

La voie de biosynthèse du composé actif est connue, et l'analyse du génome de *S. salivarius* a montré que cette bactérie possède toute la machinerie de synthèse de la molécule. Plusieurs mutants au niveau des étapes de biosynthèse de cette dernière permettant une surproduction ou l'incapacité à produire et ou à sécréter cette molécule ont été construits. Après vérification de la quantité du composé actif produit dans les surnageants de culture, les capacités anti-inflammatoires de ces mutants et de leurs surnageants seront évalués *in vitro* (répression NF- $\kappa$ B) et *in vivo* (protection dans le modèle de colite TNBS). Ce travail permettra de démontrer le rôle de ce composé.

Des petites molécules du métabolisme présentant des effets protecteurs contre l'inflammation ont été caractérisées chez d'autres bactéries commensales. Ces molécules sont généralement des dérivés du peroxyde d'hydrogène en particulier les ROS (Reactive Oxygen Species), de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou des acides organiques à courtes chaînes comme le butyrate (Kumar et al., 2007; Kumar et al., 2009a; Voltan et al., 2008).

A nos jours, aucune étude n'avait encore montré les effets immunomodulateurs de notre molécule ou de ses isomères chimiques. Il sera donc intéressant de tester les propriétés de tous ces isomères *in vitro* sur des modèles cellulaires pour déterminer si l'effet anti-inflammatoire est spécifique ou pourra être élargi. Une réponse à cette question est importante pour envisager une application future de la molécule dans le domaine de la pharmacomodulation de l'inflammation.

### **III. Mécanismes impliqués dans l'effet anti-inflammatoire de *S. salivarius* au niveau des cellules épithéliales intestinales**

Les capacités immunomodulatrices de *S. salivarius* ont été montrées sur des cellules épithéliales bronchiques, gingivales, du pharynx et des macrophages humaines (Cosseau et al., 2008; Guglielmetti et al., 2010b; Sliepen et al., 2009a; Taverniti et al., 2012). Nous avons montré que des souches de cette bactérie inhibaient aussi la voie NF-κB dans les cellules épithéliales coliques Caco-2 et monocytes THP-1. Ces observations montrent que l'effet anti-inflammatoire de *S. salivarius* n'est pas spécifique à une lignée donnée. Des effets ubiquitaires de la régulation de NF-κB par des facteurs solubles sécrétés par des probiotiques ont été observés aussi chez d'autres bactéries (Heuvelin et al., 2009; Iyer et al., 2008). Un facteur de la bactérie commensale *Lactobacillus plantarum* inhibe l'activation de NF-κB induite par divers stimuli dans différentes lignées cellulaires telles que les cellules épithéliales intestinales, les macrophages et les cellules dendritiques (Petrof et al., 2009).

Nous avons montré que l'inhibition de la voie NF-κB touche une étape intracellulaire de la signalisation. Ces résultats suggèrent que la molécule anti-inflammatoire entre dans les cellules pour exercer son effet. Il a été montré que cette dernière est transportée *via* un transporteur exprimé à la surface des cellules épithéliales intestinales (référence non communiquée pour garder la confidentialité de la molécule). Il serait intéressant d'identifier son mécanisme d'entrée dans les cellules immunes. Bien que, l'effet bénéfique de *S. salivarius* soit le même pour les cellules épithéliales et immunitaires, il est probable que les mécanismes impliqués dans le dialogue soit distincts.

Les mécanismes par lesquels les bactéries commensales et les probiotiques améliorent certaines MICI sont multiples. De nombreux travaux proposent des mécanismes d'action expliquant le rôle protecteur de ces bactéries dans certains types d'inflammation. Parmi ces mécanismes, la modulation des signaux inflammatoires des cellules épithéliales intestinales en limitant l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B a été essentiellement étudiée. La voie NF- $\kappa$ B constitue une cible privilégiée pour la régulation des signaux pro-inflammatoires. Les effets rapportés sur cette voie de transduction du signal ont montré que toutes les étapes peuvent être perturbées. Les principaux mécanismes d'inhibition de NF- $\kappa$ B documentés sont la modulation de l'activité du système ubiquitine-protéasome impliqué dans la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  (Kumar et al., 2007; Neish et al., 2000; Petrof et al., 2004b; Tien et al., 2006), l'inhibition de la phosphorylation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  (Heuvelin et al., 2009; Santos Rocha et al., 2011) et l'induction de l'export de la sous-unité RelA de NF- $\kappa$ B hors du noyau *via* un mécanisme dépendant de PPAR $\gamma$  (Kelly et al., 2004).

Dans notre étude, nous avons montré dans les cellules HT-29, que le surnageant de culture de *S. salivarius* inhibe la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  par le protéasome et diminue la translocation nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B. Ainsi, les produits de sécrétion de *S. salivarius* ciblent des étapes de la dégradation de la molécule clef dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Le métabolite bactérien favoriserait la stabilisation et l'accumulation du complexe I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylé en inhibant sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Ainsi, en maintenant la séquestration du facteur NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme de la cellule, la translocation du facteur dans le noyau est retardée et l'expression des gènes pro-inflammatoires est limitée. Ce mécanisme d'inhibition de l'activation NF- $\kappa$ B ciblant la dégradation de l'inhibiteur I $\kappa$ B en présence des bactéries commensales et probiotiques ou de leurs produits de sécrétion a été rapporté dans plusieurs études (Kumar et al., 2007; Neish et al., 2000; Sougioultzis et al., 2006). Ainsi, *Salmonella enteritidis* (non invasive), *Lactobacillus casei* ou encore le surnageant de culture du mélange probiotique VSL#3 (*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *B. infantis*, *B. longum*), inhibent la dégradation d'I $\kappa$ B *via* la diminution de l'activité du complexe ubiquitine/protéasome (Neish et al., 2000; Petrof et al., 2004b; Tien et al., 2006). Le surnageant du probiotique *Saccharomyces boulardii* inhibe la dégradation de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylée et inhibe par conséquent la translocation nucléaire de la sous unité p65 de NF- $\kappa$ B (Sougioultzis et al., 2006). De plus, Kumar et al., ont démontré que les cellules épithéliales en contact avec *L. rhamnosus GG*, *B. thetaiotaomicron*

ou *E. coli* (non pathogène) génèrent des espèces réactives de l'oxygène capables d'inhiber la neddylation de la cullin-1. Ceci diminue l'ubiquitination d'I $\kappa$ B et inhibe sa dégradation par le protéasome (Kumar et al., 2007). Ces études montrent que le système ubiquitine-protéasome est un point de contrôle critique qui est une cible de la régulation de l'activation de NF- $\kappa$ B au niveau de l'épithélium intestinal. Nous avons montré dans les cellules HT-29 que le mécanisme d'inhibition de la signalisation inflammatoire par *S. salivarius* se situe au niveau d'I $\kappa$ B- $\alpha$ . Il sera intéressant d'analyser si le ou les processus(s) de modulation engagé(s) et la ou les cible(s) dans les cellules Caco-2 et THP-1 sont identiques. Cette étude permettrait de mieux comprendre si les effets protecteurs exercés par *S. salivarius* dans l'inflammation du petit intestin et du côlon sont identiques. S'il en est ainsi, il sera possible d'élargir l'utilisation de notre molécule à d'autres pathologies inflammatoires associées à une suractivation de la voie NF- $\kappa$ B.

#### **IV. Propriétés anti-inflammatoires de *S. salivarius* sur la colite induite au TNBS**

Pour tester les réelles capacités anti-inflammatoires de *S. salivarius in vivo*, nous avons utilisé un modèle murin présentant une inflammation digestive de type colite induite au TNBS. Il a été proposé dans la littérature que la capacité d'une souche commensale ou probiotique à présenter une propriété anti-inflammatoire peut être évaluée en fonction des cytokines IL-12 et IL-10 produites par les cellules immunes les PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) (Baba et al., 2008; Foligne et al., 2007a). Une corrélation a été observée entre les profils immunomodulateurs *in vitro* et les effets thérapeutiques des différentes souches sur une colite induite au TNBS dans un modèle murin. Les souches ayant un ratio IL-10/IL-12 élevé présentent les meilleures capacités anti-inflammatoires *in vivo* (Foligne et al., 2007b; Grangette et al., 2005). Nous avons utilisé ce critère prédictif pour choisir la souche à tester sur le modèle animal. Une dizaine de souches de *S. salivarius* présentant une forte inhibition de NF- $\kappa$ B, ont été criblées *in vitro* sur les PBMCs. Les ratios IL-10/IL-12 obtenus ont montré que la souche JIM8772 présente un profil anti-inflammatoire avec un ratio IL-10/IL-12 (83) comparable à celui de *Lactobacillus salivarius* Ls 33 (104), une souche connue et étudiée pour ses propriétés anti-inflammatoires (Fernandez et al., 2011; Foligne et al., 2007c). Cette souche a été donc sélectionnée pour l'expérimentation animale.

Dans le modèle murin choisi, deux doses de TNBS ont été utilisées pour induire une colite modérée ou sévère. Nous avons mis en évidence que l'administration intragastrique de

$5 \times 10^8$  CFU de la bactérie *S. salivarius* vivante protège les souris d'environ 50% d'une colite expérimentale aigüe induite par l'administration de TNBS. La protection conférée par cette bactérie vivante est associée au niveau du côlon, à une diminution des différents paramètres d'évaluation de la sévérité de l'inflammation comme le score de Wallace (Wallace et al., 1989), d'Amého et une diminution de l'activité enzymatique de myeloperoxydase MPO produite par les neutrophiles (Bradley et al., 1982; Foligne et al., 2007a). Cette activité MPO est corrélée directement avec le degré de l'infiltration des neutrophiles polynucléaires. L'examen histologique des sections des côlons distaux de ces animaux, a également montré une forte diminution des lésions, des dommages tissulaires et de l'infiltration des cellules de la *lamina propria* causés par le TNBS. De même, leurs épithéliums coliques présentent des cryptes et des villosités de structure bien organisées comme dans un épithélium sain, appuyant et renforçant ainsi l'effet protecteur de la bactérie vivante. Aucune protection n'est observée dans le groupe prétraité avec des bactéries tuées par la chaleur, montrant l'importance de l'activité métabolique de la bactérie dans l'effet immunomodulateur exercé. Ces résultats, confirmant ceux obtenues *in vitro*, suggèrent une production de métabolites bactériens anti-inflammatoires *in situ*.

Les surnageants de *S. salivarius* introduits par voie intragastrique n'ont pas permis de démontrer un effet protecteur comme avec les bactéries vivantes puisque le milieu de culture seul pris comme contrôle était aussi protecteur. De plus, ces surnageants concentrés et introduit par voie intrapéritonéale ont présenté des effets toxiques pour les souris. Pour éviter ces contraintes, il serait intéressant de tester la molécule purifiée. Une étude semblable a montré que les produits de sécrétion de la bactérie commensale *F. prausnitzii*, dominante du microbiote intestinal, dont la présence est fortement réduite chez les patients Crohn, réduisent la sévérité de la colite chez des souris traitées au TNBS. Ces observations indiquent que le surnageant de cette bactéries délivrés directement à la muqueuse colique par voie intragastrique sont suffisants pour exercer une capacité protectrice (Sokol et al., 2008). Il est à noter que les contrôles utilisés dans cette étude ne sont pas identiques avec les nôtres, il est donc difficile de comparer l'effet de nos surnageants avec celui des surnageants de *F. prausnitzii*. Actuellement des tests sur l'inflammation portant sur l'effet de la molécule introduit par voie intragastrique sont en cours.

Dans notre étude, *S. salivarius* vivante a une activité anti-inflammatoire et serait un candidat à une utilisation comme probiotique. Les mécanismes de protection par les probiotiques dans le contexte des MICI sont probablement pour la plupart des cas complexes et multifactorielles impliquant plusieurs composants du système immunitaire colique (types

cellulaires, récepteurs, voies de signalisations), de l'épithélium intestinal ainsi que des propriétés de cet écosystème. Le(s) mécanisme(s) exact(s) de protection par *S. salivarius* contre la colite ne sont pas connus et restent à déterminer. Nous avons montré *in vitro* que cette bactérie réprime l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales intestinales et les monocytes. Ces résultats suggèrent que l'effet protecteur de *S. salivarius* pourrait passer par la réduction de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B induite suite au déclenchement de la colite par le TNBS. Pour mieux comprendre le rôle anti-inflammatoire de *S. salivarius*, la caractérisation des mécanismes responsables des effets protecteurs observés devra être identifiée à un niveau plus global. Il a été démontré dans certaines études que l'amélioration de la colite par certaines souches probiotiques impliquait l'induction de T<sub>reg</sub> *via* la production d'IL-10 et de TGF $\beta$  par les cellules coliques (Braat et al., 2004; Di Giacinto et al., 2005). La quantification de ces deux éléments et l'évaluation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse colique, pourrait clarifier en partie le mécanisme ainsi que les types et les populations cellulaires impliquées dans cette protection. De plus l'utilisation des modèles animaux invalidés pour certains gènes comme les souris IL-10<sup>-/-</sup> et Nod<sup>-/-</sup> pourrait également contribuer à décrypter les voies de signalisations engagées. Les travaux de C. Grangette ont montré que les cellules dendritiques présentent un rôle protecteur dans le modèle de la colite TNBS. En effet, les CD conditionnées avec des produits ou composés bactériens anti-inflammatoires ont été capables, après réinjection intra-péritonéale dans les souris juste avant le déclenchement de la colite, de diminuer la sévérité de cette dernière (Fernandez et al., 2011; Heuvelin et al., 2009). Il sera donc intéressant de tester l'effet d'un pré-conditionnement de cellules dendritiques isolées de la moelle osseuse de souris saines, *in vitro* par des cellules de *S. salivarius* vivantes ou mortes et avec la molécule active de cette bactérie, sur l'atténuation de la colite.

Les effets bénéfiques de différentes souches probiotiques et commensales décrites dans de nombreuses études ont été démontrés de façon très convaincante dans des modèles cellulaires et animaux. Cependant, pour la majorité de ces souches l'application chez l'homme reste encore loin d'être possible. A l'heure actuelle uniquement deux préparations bactériennes ; VSL#3 et la souche *E. coli Nissle1917* sont utilisées comme probiotiques dans le contexte de MICI. La souche *E. coli Nissle1917* est utilisée pour le maintien en rémission des patients atteints de la rectocolite hémorragiques (RCH) (Kruis et al., 2004), alors que le mixte de probiotique VSL#3 a été proposé comme support thérapeutique efficace dans la RCH et les pochites (Gionchetti et al., 2003; Gionchetti et al., 2000; Mimura et al., 2004; Venturi et al.,

1999). D'autres études ont suggéré que ce probiotique est également efficace pour réduire les colites actives (Bibiloni et al., 2005; Gionchetti et al., 2007). Nos résultats indiquent que *S. salivarius* pourrait être envisagé en tant que probiotique chez l'homme pour le traitement des MICI. Un premier point important, est que cette bactérie est commensale et a été utilisée pour d'autres applications chez l'homme. Elle est actuellement considérée comme « GRASS ». Cependant, il reste encore un certain nombre de points à explorer avant son utilisation. Des travaux sur l'implantation et le comportement de cette bactérie dans l'écosystème digestif devraient être menés, ainsi que d'évaluer les doses à apporter pour une utilisation thérapeutique dans l'organisme humain.

# Listes de publications et communications

## Publications

- **Ghalia Kaci**, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé M. Blottière and Christine Delorme Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway in Human Intestinal Epithelial Cells by Commensal *Streptococcus salivarius* † *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;10.1128/AEM.03021-10

## En preparation

- **Ghalia Kaci**, Denise Goudercourt, Véronique Dennin, Bruno Pot, J. Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé M. Blottière, Catherine Daniel and Christine Delorme. Anti-inflammatory properties of *Streptococcus salivarius* a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract

## Publications en association avec le consortium MetaIHT:

- Arumugam M ; **MetaHIT Consortium**. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011 May 12;473(7346):174-80. Epub 2011 Apr 20.
- Dusko Ehrlich S; **MetaHIT consortium**. Metagenomics of the intestinal microbiota: potential applications. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010 Sep ; 34 Suppl 1:S23-8. French.
- Qin J; **MetaHIT Consortium**. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar 4;464(7285):59-65.

## Communications orales

- **Ghalia Kaci**, Denise Goudercourt, Véronique Dennin, Bruno Pot, J. Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé M. Blottière, Catherine Daniel and Christine Delorme. Les propriétés anti-inflammatoires de la bactérie commensale *Streptococcus salivarius*. 18<sup>ème</sup> colloque du CBL (Club des Bactéries Lactiques), 22-25 Mai 2012 – Clermont Ferrand, France.
- **Ghalia Kaci**, Catherine Daniel, Brunot Pot, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé M. Blottière et Christine Delorme. Les propriétés anti-inflammatoires de la bactérie commensale *Streptococcus salivarius*. 30<sup>ème</sup> Réunion du CECED (Club d'Etude des Cellules Digestives [www.ceced.fr](http://www.ceced.fr)), 29-30 Mars 2012– Grenoble France.
- **Ghalia Kaci**, Catherine Daniel, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé M. Blottière et Christine Delorme. *Streptococcus salivarius*, une bactérie commensale au potentiel anti-inflammatoire. 29<sup>ème</sup> Réunion du CECED (Club d'Etude des Cellules Digestives [www.ceced.fr](http://www.ceced.fr)), 17-18 Mars 2011– Nice France.
- **Ghalia Kaci**, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé M. Blottière et Christine Delorme. « Modulation of NF- $\kappa$ B pathway in human intestinal epithelial cells by the commensal *Streptococcus salivarius* ». Journées des microbiologistes de l'INRA (2010), 5-7 Mai 2010 – Futuroscope de Poitiers France.

- **Ghalia Kaci**, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé M. Blottière et Christine Delorme. « Modulation of NF- $\kappa$ B pathway in human intestinal epithelial cells by the commensal *Streptococcus salivarius* ». Journées des doctorants de l'INRA (DocJ 2010), 10-11 Mai 2010 – Jouy en josas France.
- **Ghalia Kaci**, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé M. Blottière et Christine Delorme. « Modulation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales intestinales par différentes souches commensales de streptocoques du groupe salivarius ». 28<sup>ème</sup> Réunion du CECED (Club d'Etude des Cellules Digestives ; www.ceced.fr), 25-26 Mars 2010 – Paris, France.
- **Ghalia Kaci**, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé Blottière et Christine Delorme. « Modulation de la voie NF- $\kappa$ B par les différentes souches commensales de streptocoques buccaux du groupe salivarius ». 16<sup>ème</sup> colloque du CBL (Club des Bactéries Lactiques), 27-29 Mai 2009 – Toulouse, France.
- **Ghalia Kaci**, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé Blottière et Christine Delorme. « Modulation de la voie NF- $\kappa$ B par les différentes souches commensales de streptocoques buccaux du groupe salivarius ». Journées des doctorants de l'INRA (2009), 27-28 Avril 2009 – Jouy en josas, France.

## Communications affichées

- **Ghalia Kaci**, Catherine Daniel, Bruno Pot, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé Blottière and Christine Delorme. Anti-inflammatory properties of commensal *Streptococcus salivarius* on human intestinal epithelial cells and in murine TNBS-induced colitis model. The 2<sup>st</sup> MetaHIT International Conference on Human Metagenomics, Paris (France) - March 19-21, 2012.
- **Ghalia Kaci**, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Catherine Daniel, Bruno Pot, Hervé M. Blottière and Christine Delorme. «Anti-inflammatory properties of commensal *Streptococcus salivarius* on human intestinal epithelial cells and in murine TNBS induced colitis model». The CROSS-TALK WORKSHOP, Lessons from Host-Pathogens Interaction. Milano (Italy)-April 27-29, 2011
- **Ghalia Kaci**<sup>1</sup>, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé Blottière et Christine Delorme. « Les streptocoques commensaux du groupe salivarius modulent l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules épithéliales intestinales ». 17<sup>ème</sup> colloque du CBL (Club des Bactéries Lactiques), 27-29 Octobre 2010 – Nancy, France.
- **Ghalia Kaci**<sup>1</sup>, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé Blottière et Christine Delorme « Anti-inflammatory effect of commensal *Streptococcus salivarius* on human intestinal epithelial cells ». Journées de l'Ecole Doctorale ABIES (2010), 01-02 Avril 2010 – Paris, France.
- **Ghalia Kaci**, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé Blottière et Christine Delorme « Anti-inflammatory effect of commensal *Streptococcus salivarius* on human

intestinal epithelial cells». The 1<sup>st</sup> MetaHIT International Conference on Human Metagenomics, Shenzhen (China)- March 1-5, 2010.

- **Ghalia Kaci**, Omar Lakhdari, Joël Doré, S. Dusko Ehrlich, Pierre Renault, Hervé Blottière et Christine Delorme «Anti-inflammatory effect of commensal *Streptococcus salivarius* on human intestinal epithelial cells». The 5<sup>th</sup> International Conference of Gram positive Micro-Organisms, Saint-Diego (USA) - Jun 1-5, 2009.

*Références*

*Bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

- ✓ Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., and Dewhirst, F. E. (2005): Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43, 5721-32.
- ✓ Abreu, M. T. (2010): Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 10, 131-44.
- ✓ Abreu, M. T., Arnold, E. T., Thomas, L. S., Gonsky, R., Zhou, Y., Hu, B., and Arditi, M. (2002): TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 20431-7.
- ✓ Abreu, M. T., Fukata, M., and Arditi, M. (2005): TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 174, 4453-60.
- ✓ Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T., and Arditi, M. (2001): Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167, 1609-16.
- ✓ Adlerberth, I., and Wold, A. E. (2009): Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr* 98, 229-38.
- ✓ Akashi, S., Nagai, Y., Ogata, H., Oikawa, M., Fukase, K., Kusumoto, S., Kawasaki, K., Nishijima, M., Hayashi, S., Kimoto, M., and Miyake, K. (2001): Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int Immunol* 13, 1595-9.
- ✓ Akira, S. (2001): Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol* 78, 1-56.
- ✓ Akira, S. (2003): Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 5-11.
- ✓ Akira, S. (2006): TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311, 1-16.
- ✓ Alam, M., Midtvedt, T., and Uribe, A. (1994): Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* 29, 445-51.
- ✓ Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-8.
- ✓ Allen, I. C., TeKippe, E. M., Woodford, R. M., Uronis, J. M., Holl, E. K., Rogers, A. B., Herfarth, H. H., Jobin, C., and Ting, J. P. (2010): The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med* 207, 1045-56.
- ✓ Anderson, K. V. (2000): Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12, 13-9.
- ✓ Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D., and Baldwin, A. S. (2003): A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* 423, 659-63.
- ✓ Aragon, G., Graham, D. B., Borum, M., and Doman, D. B. (2010): Probiotic therapy for irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 6, 39-44.
- ✓ Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M. (2005): MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol* 40, 16-23.

- ✓ Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelier, F., Thomas, D., and Hay, R. T. (1995): Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 15, 2689-96.
- ✓ Artis, D. (2008): Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8, 411-20.
- ✓ Asquith, M. J., Boulard, O., Powrie, F., and Maloy, K. J. (2010): Pathogenic and protective roles of MyD88 in leukocytes and epithelial cells in mouse models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 139, 519-29, 529 e1-2.
- ✓ Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, II, Umesaki, Y., Itoh, K., and Honda, K. (2011): Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331, 337-41.
- ✓ Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Dore, J., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H. M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denari, G., Dervyn, R., Foerstner, K. U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Merieux, A., Melo Minardi, R., M'Rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., and Bork, P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174-80.
- ✓ Atreya, I., Atreya, R., and Neurath, M. F. (2008): NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 263, 591-6.
- ✓ Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y., and Kolls, J. K. (2008): IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14, 275-81.
- ✓ Ayabe, T., Satchell, D. P., Wilson, C. L., Parks, W. C., Selsted, M. E., and Ouellette, A. J. (2000): Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 1, 113-8.

## **B**

- ✓ Baba, N., Samson, S., Bourdet-Sicard, R., Rubio, M., and Sarfati, M. (2008): Commensal bacteria trigger a full dendritic cell maturation program that promotes the expansion of non-Tr1 suppressor T cells. *J Leukoc Biol* 84, 468-76.
- ✓ Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. (2005): Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-20.
- ✓ Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1996): NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87, 13-20.

- ✓ Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994): Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12, 141-79.
- ✓ Bai, A. P., Ouyang, Q., Xiao, X. R., and Li, S. F. (2006): Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int J Clin Pract* 60, 284-8.
- ✓ Bambou, J. C., Giraud, A., Menard, S., Begue, B., Rakotobe, S., Heyman, M., Taddei, F., Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2004): In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *J Biol Chem* 279, 42984-92.
- ✓ Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., and Clevers, H. (2007): Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003-7.
- ✓ Barnes, P. J., and Karin, M. (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336, 1066-71.
- ✓ Barnes, P. J., and Karin, M. (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336, 1066-71.
- ✓ Basak, S., Kim, H., Kearns, J. D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S. L., Benedict, C. A., Ware, C. F., Ghosh, G., Verma, I. M., and Hoffmann, A. (2007): A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* 128, 369-81.
- ✓ Beg, A. A., and Baltimore, D. (1996): An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-4.
- ✓ Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., and Baltimore, D. (1995a): Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev* 9, 2736-46.
- ✓ Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995b): Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376, 167-70.
- ✓ Beinke, S., and Ley, S. C. (2004): Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 382, 393-409.
- ✓ Berberich, I., Shu, G. L., and Clark, E. A. (1994): Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 153, 4357-66.
- ✓ Berlin, C., Bargatze, R. F., Campbell, J. J., von Andrian, U. H., Szabo, M. C., Hasslen, S. R., Nelson, R. D., Berg, E. L., Erlandsen, S. L., and Butcher, E. C. (1995): alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80, 413-22.
- ✓ Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., Holzmann, B., Weissman, I. L., Hamann, A., and Butcher, E. C. (1993): Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74, 185-95.
- ✓ Beutler, B. (2004): Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? *Nat Rev Immunol* 4, 498.
- ✓ Biasucci, G., Benenati, B., Morelli, L., Bessi, E., and Boehm, G. (2008): Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr* 138, 1796S-1800S.
- ✓ Bibiloni, R., Fedorak, R. N., Tannock, G. W., Madsen, K. L., Gionchetti, P., Campieri, M., De Simone, C., and Sartor, R. B. (2005): VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 100, 1539-46.

- ✓ Bidere, N., Ngo, V. N., Lee, J., Collins, C., Zheng, L., Wan, F., Davis, R. E., Lenz, G., Anderson, D. E., Arnoult, D., Vazquez, A., Sakai, K., Zhang, J., Meng, Z., Veenstra, T. D., Staudt, L. M., and Lenardo, M. J. (2009): Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. *Nature* 458, 92-6.
- ✓ Bik, E. M., Long, C. D., Armitage, G. C., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Gill, S. R., Fraser-Liggett, C. M., and Relman, D. A. (2010): Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *Isme J* 4, 962-74.
- ✓ Birri, D. J., Brede, D. A., and Nes, I. F. (2012): Salivaricin D, a novel intrinsically trypsin-resistant lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c isolated from a healthy infant. *Appl Environ Microbiol* 78, 402-10.
- ✓ Bjorkholm, B., Bok, C. M., Lundin, A., Rafter, J., Hibberd, M. L., and Pettersson, S. (2009): Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver. *PLoS One* 4, e6958.
- ✓ Bjursell, M. K., Martens, E. C., and Gordon, J. I. (2006): Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *J Biol Chem* 281, 36269-79.
- ✓ Blonska, M., Shambharkar, P. B., Kobayashi, M., Zhang, D., Sakurai, H., Su, B., and Lin, X. (2005): TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 280, 43056-63.
- ✓ Bocci, V. (1992): The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspect Biol Med* 35, 251-60.
- ✓ Bocker, U., Yezersky, O., Feick, P., Manigold, T., Panja, A., Kalina, U., Herweck, F., Rossol, S., and Singer, M. V. (2003): Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int J Colorectal Dis* 18, 25-32.
- ✓ Boone, D. L., Turer, E. E., Lee, E. G., Ahmad, R. C., Wheeler, M. T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., McNally, E., Pickart, C., and Ma, A. (2004): The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 5, 1052-60.
- ✓ Bouskra, D., Brezillon, C., Berard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I. G., and Eberl, G. (2008): Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456, 507-10.
- ✓ Boyton, R. J., and Altmann, D. M. (2002): Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol* 23, 526-9.
- ✓ Braat, H., van den Brande, J., van Tol, E., Hommes, D., Peppelenbosch, M., and van Deventer, S. (2004): *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *Am J Clin Nutr* 80, 1618-25.
- ✓ Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., and Rothstein, G. (1982): Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78, 206-9.
- ✓ Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R. P., and Pamer, E. G. (2007): MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII[gamma] and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* 204, 1891-1900.

- ✓ Brandtzaeg, P., Halstensen, T. S., Kett, K., Krajci, P., Kvale, D., Rognum, T. O., Scott, H., and Sollid, L. M. (1989): Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 97, 1562-84.
- ✓ Burdelya, L. G., Krivokrysenko, V. I., Tallant, T. C., Strom, E., Gleiberman, A. S., Gupta, D., Kurnasov, O. V., Fort, F. L., Osterman, A. L., Didonato, J. A., Feinstein, E., and Gudkov, A. V. (2008): An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* 320, 226-30.
- ✓ Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschoop, J., and Volpe, F. (2000): Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* 2, 346-51.
- ✓ Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., and Tschoop, J. (2003): Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* 197, 263-8.
- ✓ Burton, J. P., Wescombe, P. A., Cadieux, P. A., and Tagg, J. R. (2011): Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral streptococci? *Benef Microbes* 2, 93-101.

## C

- ✓ Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., Rizzello, F., Campieri, M., and Brigidi, P. (2008): Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol* 125, 286-92.
- ✓ Cario, E. (2010): Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis* 16, 1583-97.
- ✓ Cario, E., and Podolsky, D. K. (2000): Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68, 7010-7.
- ✓ Cario, E., and Podolsky, D. K. (2005): Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals. *Mol Immunol* 42, 887-93.
- ✓ Cario, E., Brown, D., McKee, M., Lynch-Devaney, K., Gerken, G., and Podolsky, D. K. (2002): Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol* 160, 165-73.
- ✓ Cario, E., Gerken, G., and Podolsky, D. K. (2004): Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 127, 224-38.
- ✓ Cario, E., Gerken, G., and Podolsky, D. K. (2007): Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 132, 1359-74.
- ✓ Cario, E., Golenbock, D. T., Visintin, A., Runzi, M., Gerken, G., and Podolsky, D. K. (2006): Trypsin-sensitive modulation of intestinal epithelial MD-2 as mechanism of lipopolysaccharide tolerance. *J Immunol* 176, 4258-66.
- ✓ Carmody, R. J., and Chen, Y. H. (2007): Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol* 4, 31-41.
- ✓ Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P. N., and Bowie, A. G. (2006): The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 7, 1074-81.

- ✓ Catz, S. D., and Johnson, J. L. (2001): Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20, 7342-51.
- ✓ Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M. A., Foster, S. J., Mak, T. W., Nunez, G., and Inohara, N. (2003): An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4, 702-7.
- ✓ Chen, F. E., and Ghosh, G. (1999): Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 18, 6845-52.
- ✓ Chen, G. Y., Shaw, M. H., Redondo, G., and Nunez, G. (2008): The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. *Cancer Res* 68, 10060-7.
- ✓ Chen, L. F., and Greene, W. C. (2004): Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 392-401.
- ✓ Chen, L. F., Williams, S. A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J. M., Buckbinder, L., and Greene, W. C. (2005): NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol* 25, 7966-75.
- ✓ Chen, Y. Q., Sengchanthalangsy, L. L., Hackett, A., and Ghosh, G. (2000): NF-kappaB p65 (RelA) homodimer uses distinct mechanisms to recognize DNA targets. *Structure* 8, 419-28.
- ✓ Chen, Y. Y., Clancy, K. A., and Burne, R. A. (1996): *Streptococcus salivarius* urease: genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque streptococcus. *Infect Immun* 64, 585-92.
- ✓ Cheroutre, H. (2004): Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol* 22, 217-46.
- ✓ Chilov, D., Kukk, E., Taira, S., Jeltsch, M., Kaukonen, J., Palotie, A., Joukov, V., and Alitalo, K. (1997): Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem* 272, 25176-83.
- ✓ Choe, J., Kelker, M. S., and Wilson, I. A. (2005): Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309, 581-5.
- ✓ Choi, S. H., Park, K. J., Ahn, B. Y., Jung, G., Lai, M. M., and Hwang, S. B. (2006): Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular I kappa B kinase. *Mol Cell Biol* 26, 3048-59.
- ✓ Choi, Y. J., Im, E., Chung, H. K., Pothoulakis, C., and Rhee, S. H. (2010): TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 285, 37570-8.
- ✓ Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H., and Siebenlist, U. (2002): BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3, 958-65.
- ✓ Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., and Akira, S. (2005): Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 201, 19-25.
- ✓ Cole, M. F. 1985. Influence of secretory immunoglobulin A on ecology of oral bacteria, p.131–135. In S. E. Mergenhagen and B. Rosan (ed.), *Molecular basis of oral microbial adhesion*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- ✓ Collier-Hyams, L. S., Sloane, V., Batten, B. C., and Neish, A. S. (2005): *J. Immunol.* 175, 4194-4198.

- ✓ Collier-Hyams, L. S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A. D., Bao, Z. Q., Chen, H., Madara, J. L., Orth, K., and Neish, A. S. (2002): Cutting edge: Salmonella AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* 169, 2846-50.
- ✓ Cosseau, C., Devine, D. A., Dullaghan, E., Gardy, J. L., Chikatamarla, A., Gellatly, S., Yu, L. L., Pistolic, J., Falsafi, R., Tagg, J., and Hancock, R. E. (2008): The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun* 76, 4163-75.
- ✓ Courtois, G. (2008): Tumor suppressor CYLD: negative regulation of NF-kappaB signaling and more. *Cell Mol Life Sci* 65, 1123-32.
- ✓ Crielaard, W., Zaura, E., Schuller, A. A., Huse, S. M., Montijn, R. C., and Keijser, B. J. (2011): Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med Genomics* 4, 22.
- ✓ Cummings, J. H., and Macfarlane, G. T. (1997): Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 21, 357-65.
- ✓ Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T. H., Fitzgerald, K. A., and Kelliher, M. A. (2005): Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* 280, 36560-6.

## D

- ✓ Dahan, S., Roth-Walter, F., Arnaboldi, P., Agarwal, S., and Mayer, L. (2007): Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. *Immunol Rev* 215, 243-53.
- ✓ Dave, S. H., Tilstra, J. S., Matsuoka, K., Li, F., Karrasch, T., Uno, J. K., Sepulveda, A. R., Jobin, C., Baldwin, A. S., Robbins, P. D., and Plevy, S. E. (2007): Amelioration of chronic murine colitis by peptide-mediated transduction of the IkappaB kinase inhibitor NEMO binding domain peptide. *J Immunol* 179, 7852-9.
- ✓ De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2006): Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. *Oncogene* 25, 6868-86.
- ✓ De La Cochetiere, M. F., Durand, T., Lepage, P., Bourreille, A., Galmiche, J. P., and Dore, J. (2005): Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol* 43, 5588-92.
- ✓ Defrance, T., Vanbervliet, B., Durand, I., Briolay, J., and Banchereau, J. (1992): Proliferation and differentiation of human CD5+ and CD5- B cell subsets activated through their antigen receptors or CD40 antigens. *Eur J Immunol* 22, 2831-9.
- ✓ Dejardin, E. (2006): The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 72, 1161-79.
- ✓ Delneste, Y., Beauvillain, C., and Jeannin, P. (2007): [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med Sci (Paris)* 23, 67-73.
- ✓ Dewhirst FE, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Wade WG, Yu W-H, Chen T. The Human Oral Microbiome Database. 2008. <http://www.HOMD.org>.
- ✓ DeYoung, B. J., and Innes, R. W. (2006): Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol* 7, 1243-9.

- ✓ Di Giacinto, C., Marinaro, M., Sanchez, M., Strober, W., and Boirivant, M. (2005): Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 174, 3237-46.
- ✓ Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-31.
- ✓ Dikshit, P., Chatterjee, M., Goswami, A., Mishra, A., and Jana, N. R. (2006): Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function. *J Biol Chem* 281, 29228-35.
- ✓ Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., and Knight, R. (2010): Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11971-5.
- ✓ Dubin, P. J., and Kolls, J. K. (2008): Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 226, 160-71.
- ✓ Dubuquoy, L., Jansson, E. A., Deeb, S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel, J. F., Auwerx, J., Pettersson, S., and Desreumaux, P. (2003): Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124, 1265-76.
- ✓ Dupaul-Chicoine, J., Yeretssian, G., Doiron, K., Bergstrom, K. S., McIntire, C. R., LeBlanc, P. M., Meunier, C., Turbide, C., Gros, P., Beauchemin, N., Vallance, B. A., and Saleh, M. (2010): Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity* 32, 367-78.
- ✓ Duran, A., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2003): Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *EMBO J* 22, 3910-8.

## **E**

- ✓ Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., and Relman, D. A. (2005): Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-8.
- ✓ Eckmann, L., Nebelsiek, T., Fingerle, A. A., Dann, S. M., Mages, J., Lang, R., Robine, S., Kagnoff, M. F., Schmid, R. M., Karin, M., Arkan, M. C., and Greten, F. R. (2008): Opposing functions of IKKbeta during acute and chronic intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15058-63.
- ✓ Egan, L. J., Eckmann, L., Greten, F. R., Chae, S., Li, Z. W., Myhre, G. M., Robine, S., Karin, M., and Kagnoff, M. F. (2004): IkappaB-kinasebeta-dependent NF-kappaB activation provides radioprotection to the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2452-7.
- ✓ Ellis, R. D., Goodlad, J. R., Limb, G. A., Powell, J. J., Thompson, R. P., and Punchard, N. A. (1998): Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm Res* 47, 440-5.
- ✓ Enesa, K., Zakkar, M., Chaudhury, H., Luong le, A., Rawlinson, L., Mason, J. C., Haskard, D. O., Dean, J. L., and Evans, P. C. (2008): NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling. *J Biol Chem* 283, 7036-45.
- ✓ Escoll, P., del Fresno, C., Garcia, L., Valles, G., Lendinez, M. J., Arnalich, F., and Lopez-Collazo, E. (2003): Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 465-72.

- ✓ Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Looijer-van Langen, M., and Madsen, K. L. (2008): Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G1025-34.

## F

- ✓ Facklam, R. (2002): What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15, 613-30.
- ✓ Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O., and Suzuki, K. (2010): Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol* 28, 243-73.
- ✓ Fernandez, E. M., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I. G., and Grangette, C. (2011): Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 60, 1050-9.
- ✓ Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A., Strong, R. K., Akira, S., and Aderem, A. (2004): Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917-21.
- ✓ Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poiret, S., Chamaillard, M., Pot, B., Simonet, M., and Daniel, C. (2007a): Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology* 133, 862-74.
- ✓ Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., and Pot, B. (2007b): Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 13, 236-43.
- ✓ Foligne, B., Zoumpoulou, G., Dewulf, J., Ben Younes, A., Chareyre, F., Sirard, J. C., Pot, B., and Grangette, C. (2007c): A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS One* 2, e313.
- ✓ Foo, S. Y., and Nolan, G. P. (1999): NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet* 15, 229-35.
- ✓ Fotiadis, C. I., Stoidis, C. N., Spyropoulos, B. G., and Zografos, E. D. (2008): Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 14, 6453-7.
- ✓ Franks, I. (2010): Pediatrics: Probiotics reduce the risk of necrotizing enterocolitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 358.
- ✓ Frey, A., Giannasca, K. T., Weltzin, R., Giannasca, P. J., Reggio, H., Lencer, W. I., and Neutra, M. R. (1996): Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* 184, 1045-59.
- ✓ Frick, J. S., Fink, K., Kahl, F., Niemiec, M. J., Quitadamo, M., Schenk, K., and Autenrieth, I. B. (2007a): Identification of commensal bacterial strains that modulate *Yersinia enterocolitica* and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: implications for the development of probiotics. *Infect Immun* 75, 3490-7.
- ✓ Frick, J. S., Schenk, K., Quitadamo, M., Kahl, F., Koberle, M., Bohn, E., Aepfelbacher, M., and Autenrieth, I. B. (2007b): *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* 13, 83-90.

- ✓ Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., and Girardin, S. E. (2006): Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 7, 1250-7.
- ✓ Fukata, M., Chen, A., Klepper, A., Krishnareddy, S., Vamadevan, A. S., Thomas, L. S., Xu, R., Inoue, H., Arditi, M., Dannenberg, A. J., and Abreu, M. T. (2006): Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 131, 862-77.
- ✓ Fukata, M., Michelsen, K. S., Eri, R., Thomas, L. S., Hu, B., Lukasek, K., Nast, C. C., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., Soliman, A., Arditi, M., and Abreu, M. T. (2005): Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G1055-65.
- ✓ Furrie, E., Macfarlane, S., Thomson, G., and Macfarlane, G. T. (2005): Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 115, 565-74.
- ✓ Fusunyan, R. D., Nanthakumar, N. N., Baldeon, M. E., and Walker, W. A. (2001): Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes. *Pediatr Res* 49, 589-93.

## G

- ✓ Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D., and Cerf-Bensussan, N. (2009): The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 31, 677-89.
- ✓ Garlanda, C. (2004): Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 3522-3526.
- ✓ Garlanda, C., Anders, H. J., and Mantovani, A. (2009): TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends Immunol* 30, 439-46.
- ✓ Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J., and Jenkins, M. K. (1998): Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 281, 96-9.
- ✓ Gasson, M. J. (1983): Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* 154, 1-9.
- ✓ Gazi, U., and Martinez-Pomares, L. (2009): Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214, 554-61.
- ✓ Geijtenbeek, T. B., and Gringhuis, S. I. (2009): Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 465-79.
- ✓ Gelbmann, C. M., Leeb, S. N., Vogl, D., Maendel, M., Herfarth, H., Scholmerich, J., Falk, W., and Rogler, G. (2003): Inducible CD40 expression mediates NFkappaB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts. *Gut* 52, 1448-56.
- ✓ Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L. (2001): Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167, 1882-5.
- ✓ Ghosh, S., and Karin, M. (2002): Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96.

- ✓ Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60.
- ✓ Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., and Nelson, K. E. (2006): Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355-9.
- ✓ Gilmore, T. D. (2006): Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680-4.
- ✓ Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M. (2003): Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 124, 1202-9.
- ✓ Gionchetti, P., Rizzello, F., Morselli, C., Poggioli, G., Tambasco, R., Calabrese, C., Brigidi, P., Vitali, B., Straforini, G., and Campieri, M. (2007): High-dose probiotics for the treatment of active pouchitis. *Dis Colon Rectum* 50, 2075-82; discussion 2082-4.
- ✓ Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M. (2000): Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119, 305-9.
- ✓ Girardin, S. E. (2003): Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584-1587.
- ✓ Gong, J., Xu, J., Zhu, W., Gao, X., Li, N., and Li, J. (2010): Epithelial-specific blockade of MyD88-dependent pathway causes spontaneous small intestinal inflammation. *Clin Immunol* 136, 245-56.
- ✓ Gordon, J. I., Hooper, L. V., McNevin, M. S., Wong, M., and Bry, L. (1997): Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol* 273, G565-70.
- ✓ Gorf, G., Rivera-Nieves, J., and Ley, K. (2009): Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med* 9, 836-50.
- ✓ Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., Pot, B., Hartung, T., Hols, P., and Mercenier, A. (2005): Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10321-6.
- ✓ Greten, F. R. (2004): IKK[beta] links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285-296.
- ✓ Gronlund, M. M., Lehtonen, O. P., Eerola, E., and Kero, P. (1999): Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28, 19-25.
- ✓ Guglielmetti, S., Taverniti, V., Minuzzo, M., Arioli, S., Zanoni, I., Stuknyte, M., Granucci, F., Karp, M., and Mora, D. (2010): A dairy bacterium displays in vitro probiotic properties for the pharyngeal mucosa by antagonizing group A streptococci and modulating the immune response. *Infect Immun* 78, 4734-43.
- ✓ Gusberty, F. A., Mombelli, A., Lang, N. P., and Minder, C. E. (1990): Changes in subgingival microbiota during puberty. A 4-year longitudinal study. *J Clin Periodontol* 17, 685-92.

## H

- ✓ Hacker, H., and Karin, M. (2006): Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE* 2006, re13.
- ✓ Hahn, A., Thiessen, N., Pabst, R., Buettner, M., and Bode, U. (2010): Mesenteric lymph nodes are not required for an intestinal immunoglobulin A response to oral cholera toxin. *Immunology* 129, 427-36.
- ✓ Hakalehto, E., Vilpponen-Salmela, T., Kinnunen, K., and von Wright, A. (2011): Lactic Acid bacteria enriched from human gastric biopsies. *ISRN Gastroenterol* 2011, 109183.
- ✓ Hall, J. A., Bouladoux, N., Sun, C. M., Wohlfert, E. A., Blank, R. B., Zhu, Q., Grigg, M. E., Berzofsky, J. A., and Belkaid, Y. (2008): Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity* 29, 637-49.
- ✓ Hamada, S., and Torii, M. (1980): Interaction of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* with various glucans. *J Gen Microbiol* 116, 51-9.
- ✓ Hamilton, I. A. 2000. Ecological basis for dental caries, p. 219-275. In H. K. Kuramitsu and R. P. Ellen (ed.), *Oral bacterial ecology*. Horizon Scientific Press, Wymondham, England
- ✓ Hammerschmidt, S. I., Ahrendt, M., Bode, U., Wahl, B., Kremmer, E., Forster, R., and Pabst, O. (2008): Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med* 205, 2483-90.
- ✓ Hansson, G. C., and Johansson, M. E. (2010): The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* 1, 51-54.
- ✓ Harton, J. A., Linhoff, M. W., Zhang, J., and Ting, J. P. (2002): Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol* 169, 4088-93.
- ✓ Hauer, J., Puschner, S., Ramakrishnan, P., Simon, U., Bongers, M., Federle, C., and Engelmann, H. (2005): TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2874-9.
- ✓ Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2004): Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-224.
- ✓ Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2008): Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-62.
- ✓ Hayden, M. S., West, A. P., and Ghosh, S. (2006a): NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-80.
- ✓ Hayden, M. S., West, A. P., and Ghosh, S. (2006b): SnapShot: NF-kappaB signaling pathways. *Cell* 127, 1286-7.
- ✓ He, B., Xu, W., Santini, P. A., Polydorides, A. D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., Knowles, D. M., Rescigno, M., and Cerutti, A. (2007): Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26, 812-26.
- ✓ Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forsberg, H., and Pettersson, S. (2010): Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3047-52.

- ✓ Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-9.
- ✓ Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002): Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3, 196-200.
- ✓ Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-5.
- ✓ Heuvelin, E., Lebreton, C., Grangette, C., Pot, B., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2009): Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by bifidobacterium breve soluble factors. *PLoS One* 4, e5184.
- ✓ Heuvelin, E., Lebreton, C., Grangette, C., Pot, B., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2009): Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by bifidobacterium breve soluble factors. *PLoS One* 4, e5184.
- ✓ Hiscott, J., Nguyen, T. L., Arguello, M., Nakhaei, P., and Paz, S. (2006): Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene* 25, 6844-67.
- ✓ Hitotsumatsu, O., Ahmad, R. C., Tavares, R., Wang, M., Philpott, D., Turer, E. E., Lee, B. L., Shiffin, N., Advincula, R., Malynn, B. A., Werts, C., and Ma, A. (2008): The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals. *Immunity* 28, 381-90.
- ✓ Hoberg, J. E., Popko, A. E., Ramsey, C. S., and Mayo, M. W. (2006): IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol* 26, 457-71.
- ✓ Hocker, M., and Wiedenmann, B. (1998): Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 859, 160-74.
- ✓ Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L., and Baltimore, D. (2002): The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298, 1241-5.
- ✓ Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006): Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25, 6706-16.
- ✓ Hoffmann, J. A., Reichhart, J. M., and Hetru, C. (1996): Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* 8, 8-13.
- ✓ Hold, G. L., Pryde, S. E., Russell, V. J., Furrie, E., and Flint, H. J. (2002): Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 39, 33-9.
- ✓ Honda, K., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2006): Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25, 349-60.
- ✓ Hooper, L. V., and Macpherson, A. J. (2010): Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 10, 159-69.
- ✓ Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., and Gordon, J. I. (2001): Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291, 881-4.

- ✓ Hopkins, M. J., and Macfarlane, G. T. (2002): Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 51, 448-54.
- ✓ Hord, N. G. (2008): Eukaryotic-microbiota crosstalk: potential mechanisms for health benefits of prebiotics and probiotics. *Annu Rev Nutr* 28, 215-31.
- ✓ Hornef, M. W., Frisan, T., Vandewalle, A., Normark, S., and Richter-Dahlfors, A. (2002): Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 195, 559-70.
- ✓ Hornef, M. W., Normark, B. H., Vandewalle, A., and Normark, S. (2003): Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 198, 1225-35.
- ✓ Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S., and Hartmann, G. (2005): Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11, 263-70.
- ✓ Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-52.
- ✓ Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., and Goeddel, D. V. (1996): TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-96.
- ✓ Huang, D. B., Vu, D., and Ghosh, G. (2005): NF- $\kappa$ B RelB forms an intertwined homodimer. *Structure* 13, 1365-73.
- ✓ Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H., and Miyamoto, S. (2003): Sequential modification of NEMO/IKK $\gamma$  by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- $\kappa$ B activation by genotoxic stress. *Cell* 115, 565-76.
- ✓ Huang, W. C., Ju, T. K., Hung, M. C., and Chen, C. C. (2007): Phosphorylation of CBP by IKK $\alpha$  promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF- $\kappa$ B. *Mol Cell* 26, 75-87.
- ✓ Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., and Thomas, G. (2001): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603.
- ✓ Hymowitz, S. G., and Wertz, I. E. (2010): A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 10, 332-41.

## I

- ✓ Iademarco, M. F., McQuillan, J. J., Rosen, G. D., and Dean, D. C. (1992): Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 267, 16323-9.
- ✓ Ishikawa, H., Tanaka, K., Maeda, Y., Aiba, Y., Hata, A., Tsuji, N. M., Koga, Y., and Matsumoto, T. (2008): Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol* 153, 127-35.

- ✓ Israel, A., Le Bail, O., Hatat, D., Piette, J., Kieran, M., Logeat, F., Wallach, D., Fellous, M., and Kourilsky, P. (1989): TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF kappa B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *Embo J* 8, 3793-800.
- ✓ Ivanov, II, Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D. B., Sartor, R. B., Finlay, B. B., and Littman, D. R. (2008): Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 4, 337-49.
- ✓ Iwanaga, R., Ozono, E., Fujisawa, J., Ikeda, M. A., Okamura, N., Huang, Y., and Ohtani, K. (2008): Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene* 27, 5635-42.
- ✓ Iyer, C., Kusters, A., Sethi, G., Kunnumakkara, A. B., Aggarwal, B. B., and Versalovic, J. (2008): Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. *Cell Microbiol* 10, 1442-52.
- ✓ Izcue, A., and Powrie, F. (2008): Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology* 123, 6-10.

## J

- ✓ Jack, R. W., Tagg, J. R., and Ray, B. (1995): Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59, 171-200.
- ✓ Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J. L., Berg, P. L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., and Agace, W. W. (2008): Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 205, 2139-49.
- ✓ Jakobsson, H. E., Jernberg, C., Andersson, A. F., Sjolund-Karlsson, M., Jansson, J. K., and Engstrand, L. (2010): Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One* 5, e9836.
- ✓ Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- ✓ Janssens, S., and Tschopp, J. (2006): Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ* 13, 773-84.
- ✓ Jernberg, C., Lofmark, S., Edlund, C., and Jansson, J. K. (2007): Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *Isme J* 1, 56-66.
- ✓ Jilling, T., Simon, D., Lu, J., Meng, F. J., Li, D., Schy, R., Thomson, R. B., Soliman, A., Arditi, M., and Caplan, M. S. (2006): The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *J Immunol* 177, 3273-82.
- ✓ Jimenez, E., Fernandez, L., Marin, M. L., Martin, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., and Rodriguez, J. M. (2005): Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 51, 270-4.
- ✓ Jimenez, E., Marin, M. L., Martin, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., Fernandez, L., and Rodriguez, J. M. (2008): Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 159, 187-93.

- ✓ Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H., and Lee, J. O. (2007): Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130, 1071-82.
- ✓ Jobin, C., Haskill, S., Mayer, L., Panja, A., and Sartor, R. B. (1997): Evidence for altered regulation of I kappa B alpha degradation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* 158, 226-34.
- ✓ Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G. C. (2008): The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15064-9.
- ✓ Jumpertz, R., Le, D. S., Turnbaugh, P. J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon, J. I., and Krakoff, J. (2011): Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 94, 58-65.
- ✓ Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002): Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3, 499.
- ✓ Juste, C. (2005): [Dietary fatty acids, intestinal microbiota and cancer]. *Bull Cancer* 92, 708-21.

## **K**

- ✓ Kaci, G., Lakhdari, O., Dore, J., Ehrlich, S. D., Renault, P., Blottiere, H. M., and Delorme, C. (2011): Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway in Human Intestinal Epithelial Cells by Commensal *Streptococcus salivarius*. *Appl Environ Microbiol* 77, 4681-4.
- ✓ Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K., and Akira, S. (2001): Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166, 5688-94.
- ✓ Kajino-Sakamoto, R., Inagaki, M., Lippert, E., Akira, S., Robine, S., Matsumoto, K., Jobin, C., and Ninomiya-Tsuji, J. (2008): Enterocyte-derived TAK1 signaling prevents epithelium apoptosis and the development of ileitis and colitis. *J Immunol* 181, 1143-52.
- ✓ Kang, J. Y., Nan, X., Jin, M. S., Youn, S. J., Ryu, Y. H., Mah, S., Han, S. H., Lee, H., Paik, S. G., and Lee, J. O. (2009): Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31, 873-84.
- ✓ Kang, S. S., Woo, S. S., Im, J., Yang, J. S., Yun, C. H., Ju, H. R., Son, C. G., Moon, E. Y., and Han, S. H. (2007): Human placenta promotes IL-8 expression through activation of JNK/SAPK and transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 in PMA-differentiated THP-1 cells. *Int Immunopharmacol* 7, 1488-95.
- ✓ Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P., Akira, S., and Nunez, G. (2006): Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440, 233-6.
- ✓ Kapsenberg, M. L. (2003): Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984-93.
- ✓ Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-63.
- ✓ Karin, M., and Delhase, M. (2000): The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* 12, 85-98.

- ✓ Karin, M., Yamamoto, Y., and Wang, Q. M. (2004): The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3, 17-26.
- ✓ Karrasch, T., Kim, J. S., Muhlbauer, M., Magness, S. T., and Jobin, C. (2007): Gnotobiotic IL-10-/-;NF-kappa B(EGFP) mice reveal the critical role of TLR/NF-kappa B signaling in commensal bacteria-induced colitis. *J Immunol* 178, 6522-32.
- ✓ Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R. S. (2010): Inflammatory bowel disease. *Annual review of immunology* 28, 573-621.
- ✓ Kawai, T., and Akira, S. (2007a): Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13, 460-9.
- ✓ Kawai, T., and Akira, S. (2007b): SnapShot: Pattern-recognition receptors. *Cell* 129, 1024.
- ✓ Kawai, T., and Akira, S. (2008): Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1143, 1-20.
- ✓ Kawai, T., and Akira, S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-84.
- ✓ Kearns, J. D., Basak, S., Werner, S. L., Huang, C. S., and Hoffmann, A. (2006): IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *J Cell Biol* 173, 659-64.
- ✓ Kellum, J. A., Song, M., and Li, J. (2004): Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R686-92.
- ✓ Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G., Pettersson, S., and Conway, S. (2004): Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 5, 104-12.
- ✓ Keshav, S. (2006): Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *J Leukoc Biol* 80, 500-8.
- ✓ Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R. A. (2005): Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307, 731-4.
- ✓ Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2002): IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110, 191-202.
- ✓ Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., and Ley, R. E. (2011): Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1, 4578-85.
- ✓ Kolenko, V., Bloom, T., Rayman, P., Bukowski, R., Hsi, E., and Finke, J. (1999): Inhibition of NF-kappa B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase-1 and -3. *J Immunol* 163, 590-8.
- ✓ Kononen, E. (2000): Development of oral bacterial flora in young children. *Ann Med* 32, 107-12.
- ✓ Kononen, E., Jousimies-Somer, H., and Asikainen, S. (1992): Relationship between oral gram-negative anaerobic bacteria in saliva of the mother and the colonization of her edentulous infant. *Oral Microbiol Immunol* 7, 273-6.
- ✓ Kononen, E., Jousimies-Somer, H., Bryk, A., Kilp, T., and Kilian, M. (2002): Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J Med Microbiol* 51, 723-30.

- ✓ Koslowski, M. J., Beisner, J., Stange, E. F., and Wehkamp, J. (2009): Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* 300, 34-40.
- ✓ Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D., and Courtois, G. (2003): The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424, 801-5.
- ✓ Krikos, A., Laherty, C. D., and Dixit, V. M. (1992): Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 267, 17971-6.
- ✓ Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukas, M., Fixa, B., Kascak, M., Kamm, M. A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., and Schulze, J. (2004): Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617-23.
- ✓ Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y., and Gelinas, C. (2003): To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8961-82.
- ✓ Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L. S., Hansen, J. M., Li, T., Yamoah, K., Pan, Z. Q., Jones, D. P., and Neish, A. S. (2007): Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J* 26, 4457-66.
- ✓ Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L. S., Kwon, Y. M., Hanson, J. M., and Neish, A. S. (2009): The bacterial fermentation product butyrate influences epithelial signaling via reactive oxygen species-mediated changes in cullin-1 neddylation. *J Immunol* 182, 538-46.
- ✓ Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009): Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 420, 1-16.

## L

- ✓ Lai, Y., and Gallo, R. L. (2009): AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30, 131-41.
- ✓ Lakhdari, O., Cultrone, A., Tap, J., Gloux, K., Bernard, F., Ehrlich, S. D., Lefevre, F., Dore, J., and Blottiere, H. M. (2010): Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF-kappaB modulation in the human gut. *PLoS One* 5.
- ✓ Lakhdari, O., Tap, J., Beguet-Crespel, F., Le Roux, K., de Wouters, T., Cultrone, A., Nepelska, M., Lefevre, F., Dore, J., and Blottiere, H. M. (2011): Identification of NF-kappaB modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria. *J Biomed Biotechnol* 2011, 282356.
- ✓ Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G. Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005): IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434, 1138-43.
- ✓ Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmstrom, K., Rajilic, M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M., Collins, M. D., Thiel, R., Namsolleck, P., Blaut, M., and Dore, J. (2005): Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* 71, 4153-5.
- ✓ Lebeis, S. L., Powell, K. R., Merlin, D., Sherman, M. A., and Kalman, D. (2009): Interleukin-1 receptor signaling protects mice from lethal intestinal damage caused by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 77, 604-14.

- ✓ Lee, E. G., Boone, D. L., Chai, S., Libby, S. L., Chien, M., Lodolce, J. P., and Ma, A. (2000): Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289, 2350-4.
- ✓ Lee, H. C., and Ziegler, S. F. (2007): Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 914-9.
- ✓ Lee, H. M., Shin, D. M., Choi, D. K., Lee, Z. W., Kim, K. H., Yuk, J. M., Kim, C. D., Lee, J. H., and Jo, E. K. (2009): Innate immune responses to *Mycobacterium ulcerans* via toll-like receptors and dectin-1 in human keratinocytes. *Cell Microbiol* 11, 678-92.
- ✓ Lee, J., Mo, J. H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A. N., Liu, Y. T., Lee, H. K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., Kagnoff, M., Eckmann, L., Ben-Neriah, Y., and Raz, E. (2006): Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 8, 1327-36.
- ✓ Lefebvre, M., Paulweber, B., Fajas, L., Woods, J., McCrary, C., Colombel, J. F., Najib, J., Fruchart, J. C., Datz, C., Vidal, H., Desreumaux, P., and Auwerx, J. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* 162, 331-40.
- ✓ Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-83.
- ✓ Lenoir, C., Sapin, C., Broquet, A. H., Jouniaux, A. M., Bardin, S., Gasnereau, I., Thomas, G., Seksik, P., Trugnan, G., Masliah, J., and Bachelet, M. (2008): MD-2 controls bacterial lipopolysaccharide hyporesponsiveness in human intestinal epithelial cells. *Life Sci* 82, 519-28.
- ✓ Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005): Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11070-5.
- ✓ Li, Q., Estepa, G., Memet, S., Israel, A., and Verma, I. M. (2000): Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev* 14, 1729-33.
- ✓ Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., and O'Neill, L. A. (2005): Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5, 446-58.
- ✓ Lin, Y., Bai, L., Chen, W., and Xu, S. (2010): The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 14, 45-55.
- ✓ Lindberg, E., Adlerberth, I., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I. L., Aberg, N., and Wold, A. E. (2004): High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. *J Clin Microbiol* 42, 530-4.
- ✓ Listgarten, M. A. (1976): Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 47, 1-18.
- ✓ Liu, B., Mink, S., Wong, K. A., Stein, N., Getman, C., Dempsey, P. W., Wu, H., and Shuai, K. (2004): PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol* 5, 891-8.
- ✓ Liu, B., Yang, R., Wong, K. A., Getman, C., Stein, N., Teitell, M. A., Cheng, G., Wu, H., and Shuai, K. (2005): Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1. *Mol Cell Biol* 25, 1113-23.

- ✓ Liu, H. H., Xie, M., Schneider, M. D., and Chen, Z. J. (2006): Essential role of TAK1 in thymocyte development and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11677-82.
- ✓ Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J. N., Shiloach, J., Segal, D. M., and Davies, D. R. (2008): Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 320, 379-81.
- ✓ Liu, Y. J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y. H., Malefyt Rde, W., Omori, M., Zhou, B., and Ziegler, S. F. (2007): TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* 25, 193-219.
- ✓ Llopis, M., Antolin, M., Carol, M., Borrueal, N., Casellas, F., Martinez, C., Espin-Basany, E., Guarner, F., and Malagelada, J. R. (2009): *Lactobacillus casei* downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis* 15, 275-83.
- ✓ Lotz, M. (2006): Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* 203, 973-984.

## M

- ✓ Ma, D., Forsythe, P., and Bienenstock, J. (2004): Live *Lactobacillus rhamnosus* [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun* 72, 5308-14.
- ✓ Macdonald, T. T., and Monteleone, G. (2005): Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307, 1920-1955.
- ✓ Macfarlane, G. T., Cummings, J. H., and Allison, C. (1986): Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* 132, 1647-56.
- ✓ Macpherson, A. J., and Harris, N. L. (2004): Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Rev. Immunol.* 4, 478-485.
- ✓ Madara, J. L., Nash, S., Moore, R., and Atisook, K. (1990): Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monogr Pathol*, 306-24.
- ✓ Maine, G. N., Mao, X., Komarck, C. M., and Burstein, E. (2007): COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *Embo J* 26, 436-47.
- ✓ Malek, S., Huxford, T., and Ghosh, G. (1998): Ikappa Balpha functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF-kappaB. *J Biol Chem* 273, 25427-35.
- ✓ Malley, R., Henneke, P., Morse, S. C., Cieslewicz, M. J., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Kurt-Jones, E., Paton, J. C., Wessels, M. R., and Golenbock, D. T. (2003): Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1966-71.
- ✓ Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., Lee, W. P., Roose-Girma, M., Erickson, S., and Dixit, V. M. (2004): Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430, 213-8.
- ✓ Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., and Dixit, V. M. (2006): Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228-32.
- ✓ Marsh, P. D., Percival, R. S., and Challacombe, S. J. (1992): The influence of denture-wearing and age on the oral microflora. *J Dent Res* 71, 1374-81.

- ✓ Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002): The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10, 417-26.
- ✓ Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006): Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237-41.
- ✓ Massey-Harroche, D. (2000): Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. *Microsc Res Tech* 49, 353-62.
- ✓ Mathes, E., O'Dea, E. L., Hoffmann, A., and Ghosh, G. (2008): NF-kappaB dictates the degradation pathway of IkappaBalpha. *Embo J* 27, 1357-67.
- ✓ Mauro, C., Pacifico, F., Lavorgna, A., Mellone, S., Iannetti, A., Acquaviva, R., Formisano, S., Vito, P., and Leonardi, A. (2006): ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB. *J Biol Chem* 281, 18482-8.
- ✓ May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glockner, J., Pober, J. S., and Ghosh, S. (2000): Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 289, 1550-4.
- ✓ Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., and Kasper, D. L. (2005): An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107-18.
- ✓ McAuley, J. L. (2007): MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J. Clin. Invest.* 117, 2313-2324.
- ✓ McCaffrey, P. G., Kim, P. K., Valge-Archer, V. E., Sen, R., and Rao, A. (1994): Cyclosporin A sensitivity of the NF-kappa B site of the IL2R alpha promoter in untransformed murine T cells. *Nucleic Acids Res* 22, 2134-42.
- ✓ McDade, T. P., Perugini, R. A., Vittimberga, F. J., Jr., Carrigan, R. C., and Callery, M. P. (1999): Salicylates inhibit NF-kappaB activation and enhance TNF-alpha-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 83, 56-61.
- ✓ Medzhitov, R., and Horng, T. (2009): Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 9, 692-703.
- ✓ Melmed, G., Thomas, L. S., Lee, N., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., Michelsen, K. S., Zhou, Y., Hu, B., Arditi, M., and Abreu, M. T. (2003): Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 170, 1406-15.
- ✓ Menard, S., Candalh, C., Bambou, J. C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2004): Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 53, 821-8.
- ✓ Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., and Rao, A. (1997): IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278, 860-6.
- ✓ Meyer, S., Kohler, N. G., and Joly, A. (1997): Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 413, 354-8.
- ✓ Meyer-Hoffert, U., Hornef, M. W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L. G., Midtvedt, T., Putsep, K., and Andersson, M. (2008): Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* 57, 764-71.
- ✓ Meylan, E., and Tschopp, J. (2005): The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* 30, 151-9.

- ✓ Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006): Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442, 39-44.
- ✓ Midtvedt, A. C., and Midtvedt, T. (1992): Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 15, 395-403.
- ✓ Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, I. C., Nicholls, R. J., Gionchetti, P., Campieri, M., and Kamm, M. A. (2004): Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 53, 108-14.
- ✓ Mostefaoui, Y., Bart, C., Frenette, M., and Rouabhia, M. (2004): *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius* modulate IL-6, IL-8, and TNF-alpha expression and secretion by engineered human oral mucosa cells. *Cell Microbiol* 6, 1085-96.
- ✓ Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., and Muta, T. (2005): Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein. *J Biol Chem* 280, 7444-51.
- ✓ Mowat, A. M. (2003): Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-41.
- ✓ Moynagh, P. N. (2005): The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* 118, 4589-92.
- ✓ Mueller, T., Terada, T., Rosenberg, I. M., Shibolet, O., and Podolsky, D. K. (2006): Th2 cytokines down-regulate TLR expression and function in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 176, 5805-14.

## N

- ✓ Nagashima, K., Sasseville, V. G., Wen, D., Bielecki, A., Yang, H., Simpson, C., Grant, E., Hepperle, M., Harriman, G., Jaffee, B., Ocain, T., Xu, Y., and Fraser, C. C. (2006): Rapid TNFR1-dependent lymphocyte depletion in vivo with a selective chemical inhibitor of IKKbeta. *Blood* 107, 4266-73.
- ✓ Nanno, M., Shiohara, T., Yamamoto, H., Kawakami, K., and Ishikawa, H. (2007): gammadelta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. *Immunol Rev* 215, 103-13.
- ✓ Natoli, G., and Chioocca, S. (2008): Nuclear ubiquitin ligases, NF-kappaB degradation, and the control of inflammation. *Sci Signal* 1, pe1.
- ✓ Neish, A. S., Gewirtz, A. T., Zeng, H., Young, A. N., Hobert, M. E., Karmali, V., Rao, A. S., and Madara, J. L. (2000): Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 289, 1560-3.
- ✓ Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., Gumucio, D., Neurath, M. F., and Pasparakis, M. (2007): Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 446, 557-61.
- ✓ Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., and Foster, J. A. (2010): Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil* 23, 255-64, e119.
- ✓ Neurath, M. F., Becker, C., and Barbutescu, K. (1998): Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 43, 856-60.
- ✓ Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Strober, W. (1996): Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 2, 998-1004.

- ✓ Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Strober, W. (1996): Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 2, 998-1004.
- ✓ Neutra, M. R., Frey, A., and Kraehenbuhl, J. P. (1996): Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86, 345-8.
- ✓ Neznanov, N., Chumakov, K. M., Neznanova, L., Almasan, A., Banerjee, A. K., and Gudkov, A. V. (2005): Proteolytic cleavage of the p65-RelA subunit of NF-kappaB during poliovirus infection. *J Biol Chem* 280, 24153-8.
- ✓ Nichols, D. B., and Shisler, J. L. (2006): The MC160 protein expressed by the dermatotropic poxvirus molluscum contagiosum virus prevents tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation via inhibition of I kappa kinase complex formation. *J Virol* 80, 578-86.
- ✓ Niess, J. H., Leithauser, F., Adler, G., and Reimann, J. (2008): Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions. *J Immunol* 180, 559-68.
- ✓ Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I. L., Aberg, N., Wold, A. E., and Adlerberth, I. (2003): *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res* 54, 8-14.

## O

- ✓ Ogawa, A., Furukawa, S., Fujita, S., Mitobe, J., Kawarai, T., Narisawa, N., Sekizuka, T., Kuroda, M., Ochiai, K., Ogihara, H., Kosono, S., Yoneda, S., Watanabe, H., Morinaga, Y., Uematsu, H., and Senpuku, H. (2011): Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Appl Environ Microbiol* 77, 1572-80.
- ✓ Ogawa, S., Lozach, J., Benner, C., Pascual, G., Tangirala, R. K., Westin, S., Hoffmann, A., Subramaniam, S., David, M., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (2005): Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122, 707-21.
- ✓ O'Hara, A. M., and Shanahan, F. (2006): The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7, 688-93.
- ✓ O'Neill, L. A., and Bowie, A. G. (2007): The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7, 353-64.
- ✓ Orth, K., Palmer, L. E., Bao, Z. Q., Stewart, S., Rudolph, A. E., Bliska, J. B., and Dixon, J. E. (1999): Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* 285, 1920-3.
- ✓ Osborn, L., Kunkel, S., and Nabel, G. J. (1989): Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2336-40.
- ✓ Otte, J. M., Cario, E., and Podolsky, D. K. (2004): Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126, 1054-70.
- ✓ Ouyang, W., Kolls, J. K., and Zheng, Y. (2008): The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454-67.

## P

- ✓ Pahl, H. L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-66.
- ✓ Pahl, H. L., Krauss, B., Schulze-Osthoff, K., Decker, T., Traenckner, E. B., Vogt, M., Myers, C., Parks, T., Warring, P., Muhlbacher, A., Czernilofsky, A. P., and Baeuerle, P. A. (1996): The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *J Exp Med* 183, 1829-40.
- ✓ Pai, S. Y., Levy, O., Jabara, H. H., Glickman, J. N., Stoler-Barak, L., Sachs, J., Nurko, S., Orange, J. S., and Geha, R. S. (2008): Allogeneic transplantation successfully corrects immune defects, but not susceptibility to colitis, in a patient with nuclear factor-kappaB essential modulator deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 122, 1113-1118 e1.
- ✓ Pallone, F., and Monteleone, G. (2001): Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 17, 307-12.
- ✓ Papaioannou, W., Gizani, S., Haffajee, A. D., Quirynen, M., Mamai-Homata, E., and Papagiannoulis, L. (2009): The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol Immunol* 24, 183-9.
- ✓ Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., and Lee, J. O. (2009): The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191-5.
- ✓ Park, H. K., Shim, S. S., Kim, S. Y., Park, J. H., Park, S. E., Kim, H. J., Kang, B. C., and Kim, C. M. (2005): Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J Microbiol* 43, 345-53.
- ✓ Parrot, M., Charest, M., and Lavoie, M. C. (1989): Production of mutacin-like substances by *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol* 35, 366-72.
- ✓ Pasparakis, M. (2009): Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 9, 778-88.
- ✓ Pearce, C., Bowden, G. H., Evans, M., Fitzsimmons, S. P., Johnson, J., Sheridan, M. J., Wientzen, R., and Cole, M. F. (1995): Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. *J Med Microbiol* 42, 67-72.
- ✓ Pedersen, G., Andresen, L., Matthiessen, M. W., Rask-Madsen, J., and Brynskov, J. (2005): Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol* 141, 298-306.
- ✓ Percival, R. S., Challacombe, S. J., and Marsh, P. D. (1994): Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res* 73, 1416-20.
- ✓ Perez, P. F., Dore, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E. J., and Donnet-Hughes, A. (2007): Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119, e724-32.
- ✓ Perkins, N. D., and Gilmore, T. D. (2006): Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 13, 759-72.
- ✓ Peterson, D. A., McNulty, N. P., Guruge, J. L., and Gordon, J. I. (2007): IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2, 328-39.
- ✓ Petrof, E. O., Ciancio, M. J., and Chang, E. B. (2004): Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chin J Dig Dis* 5, 45-50.

- ✓ Petrof, E. O., Claud, E. C., Sun, J., Abramova, T., Guo, Y., Waypa, T. S., He, S. M., Nakagawa, Y., and Chang, E. B. (2009): Bacteria-free solution derived from *Lactobacillus plantarum* inhibits multiple NF-kappaB pathways and inhibits proteasome function. *Inflamm Bowel Dis* 15, 1537-47.
- ✓ Petrof, E. O., Kojima, K., Ropeleski, M. J., Musch, M. W., Tao, Y., De Simone, C., and Chang, E. B. (2004): Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 127, 1474-87.
- ✓ Phelps, C. B., Sengchanthalangsy, L. L., Huxford, T., and Ghosh, G. (2000): Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers. *J Biol Chem* 275, 29840-6.
- ✓ Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-8.
- ✓ Powrie, F., Read, S., Mottet, C., Uhlig, H., and Maloy, K. (2003): Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Found Symp* 252, 92-8; discussion 98-105, 106-14.
- ✓ Pulendran, B., Tang, H., and Denning, T. L. (2008): Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20, 61-7.
- ✓ Putsep, K., Axelsson, L. G., Boman, A., Midtvedt, T., Normark, S., Boman, H. G., and Andersson, M. (2000): Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins. *J Biol Chem* 275, 40478-82.

## Q

- ✓ Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J. M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S. D., and Wang, J. (2010): A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65.
- ✓ Qiu, D., Zhao, G., Aoki, Y., Shi, L., Uyei, A., Nazarian, S., Ng, J. C., and Kao, P. N. (1999): Immunosuppressant PG490 (triptolide) inhibits T-cell interleukin-2 expression at the level of purine-box/nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* 274, 13443-50.

## R

- ✓ Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2008): Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1, S10-4.
- ✓ Rakoff-Nahoum, S., Hao, L., and Medzhitov, R. (2006): Role of Toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 25, 319-329.
- ✓ Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004): Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229-41.

- ✓ Razani, B., Zarnegar, B., Ytterberg, A. J., Shiba, T., Dempsey, P. W., Ware, C. F., Loo, J. A., and Cheng, G. (2010): Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation. *Sci Signal* 3, ra41.
- ✓ Rehli, M., Poltorak, A., Schwarzfischer, L., Krause, S. W., Andreesen, R., and Beutler, B. (2000): PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J Biol Chem* 275, 9773-81.
- ✓ Rescigno, M., Rotta, G., Valzasina, B., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001): Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204, 572-81.
- ✓ Revilla, Y., Callejo, M., Rodriguez, J. M., Culebras, E., Nogal, M. L., Salas, M. L., Vinuela, E., and Fresno, M. (1998): Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J Biol Chem* 273, 5405-11.
- ✓ Rhee, S. H., Im, E., Riegler, M., Kokkotou, E., O'Brien, M., and Pothoulakis, C. (2005): Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13610-5.
- ✓ Riggio, M. P., Aga, H., Murray, C. A., Jackson, M. S., Lennon, A., Hammersley, N., and Bagg, J. (2007): Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103, 610-7.
- ✓ Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005): Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-14.
- ✓ Rocha, S., Martin, A. M., Meek, D. W., and Perkins, N. D. (2003): p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 23, 4713-27.
- ✓ Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J., and Gross, V. (1998): Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115, 357-69.
- ✓ Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998): IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* 395, 297-300.
- ✓ Roturier, J. M., Le Bars, D., and Gripon, J. C. (1995): Separation and identification of hydrophilic peptides in dairy products using FMOC derivatization. *J Chromatogr A* 696, 209-17.
- ✓ Round, J. L., and Mazmanian, S. K. (2009): The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 313-23.
- ✓ Round, J. L., and Mazmanian, S. K. (2010): Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12204-9.
- ✓ Ruefli-Brasse, A. A., Lee, W. P., Hurst, S., and Dixit, V. M. (2004): Rip2 participates in Bcl10 signaling and T-cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 279, 1570-4.
- ✓ Ruprecht, C. R., and Lanzavecchia, A. (2006): Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* 36, 810-6.
- ✓ Russo, M. P., Schwabe, R. F., Sartor, R. B., and Jobin, C. (2004): NF-kappaB-inducing kinase restores defective IkappaB kinase activity and NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells. *Cell Signal* 16, 741-50.

## S

- ✓ Saegusa, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S., and Hosoi, T. (2004): *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* induce interleukin-8 production from intestinal epithelial-like Caco-2 cells in the presence of butyric acid. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41, 227-35.
- ✓ Saito, N., Courtois, G., Chiba, A., Yamamoto, N., Nitta, T., Hironaka, N., Rowe, M., Yamamoto, N., and Yamaoka, S. (2003): Two carboxyl-terminal activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF-kappaB through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. *J Biol Chem* 278, 46565-75.
- ✓ Saitoh, S., and Miyake, K. (2009): Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol Rev* 227, 32-43.
- ✓ Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-64.
- ✓ Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008): Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-87.
- ✓ Salcedo, R., Worschech, A., Cardone, M., Jones, Y., Gyulai, Z., Dai, R. M., Wang, E., Ma, W., Haines, D., O'HUigin, C., Marincola, F. M., and Trinchieri, G. (2010): MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med* 207, 1625-36.
- ✓ Salzman, N. H. (2010): Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: Detente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* 1, 401-406.
- ✓ Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2003): Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 15, 763-70.
- ✓ Sansonetti, P. J. (2004): War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 4, 953-64.
- ✓ Santagati, M., Scillato, M., Patane, F., Aiello, C., and Stefani, S. (2012): Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012.
- ✓ Santos Rocha, C., Lakhdari, O., Blottiere, H. M., Blugeon, S., Sokol, H., Bermudez-Humara'n, L. G., Azevedo, V., Miyoshi, A., Dore, J., Langella, P., Maguin, E., and van de Guchte, M. (2011): Anti-inflammatory properties of dairy lactobacilli. *Inflamm Bowel Dis* 2011, 21834.
- ✓ Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005): Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 1087-95.
- ✓ Savinova, O. V., Hoffmann, A., and Ghosh, G. (2009): The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes. *Mol Cell* 34, 591-602.
- ✓ Scannapieco, F. A. (1994): Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 5, 203-48.
- ✓ Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D., and Arigoni, F. (2002): The

genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14422-7.

- ✓ Schesser, K., Spiik, A. K., Dukuzumuremyi, J. M., Neurath, M. F., Pettersson, S., and Wolf-Watz, H. (1998): The *yopJ* locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* 28, 1067-79.
- ✓ Schreiber, S., Nikolaus, S., and Hampe, J. (1998): Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 42, 477-84.
- ✓ Schuerer-Maly, C. C., Eckmann, L., Kagnoff, M. F., Falco, M. T., and Maly, F. E. (1994): Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 81, 85-91.
- ✓ Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C. J. (1999): Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274, 17406-9.
- ✓ Sellon, R. K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L. A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D. M., and Sartor, R. B. (1998): Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 66, 5224-31.
- ✓ Sen, R., and Baltimore, D. (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-16.
- ✓ Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. (2001): Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science* 293, 1495-9.
- ✓ Sethi, G., Sung, B., and Aggarwal, B. B. (2008): Nuclear factor- $\kappa$ B activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 21-31.
- ✓ Shanahan, F. (2002): The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16, 915-31.
- ✓ Shibata, W., Takaishi, S., Muthupalani, S., Pritchard, D. M., Whary, M. T., Rogers, A. B., Fox, J. G., Betz, K. S., Kaestner, K. H., Karin, M., and Wang, T. C. (2010): Conditional deletion of IkappaB-kinase-beta accelerates helicobacter-dependent gastric apoptosis, proliferation, and preneoplasia. *Gastroenterology* 138, 1022-34 e1-10.
- ✓ Shibolet, O., and Podolsky, D. K. (2007): TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1469-73.
- ✓ Shim, J. H., Xiao, C., Paschal, A. E., Bailey, S. T., Rao, P., Hayden, M. S., Lee, K. Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., and Ghosh, S. (2005): TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 19, 2668-81.
- ✓ Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-82.

- ✓ Sissons, C. H., and Yakub, S. (2000): Suppression of urease levels in *Streptococcus salivarius* by cysteine, related compounds and by sulfide. *Oral Microbiol Immunol* 15, 317-24.
- ✓ Slack, E., Hapfelmeier, S., Stecher, B., Velykoredko, Y., Stoel, M., Lawson, M. A., Geuking, M. B., Beutler, B., Tedder, T. F., Hardt, W. D., Bercik, P., Verdu, E. F., McCoy, K. D., and Macpherson, A. J. (2009): Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* 325, 617-20.
- ✓ Slieden, I., Van Damme, J., Van Essche, M., Loozen, G., Quirynen, M., and Teughels, W. (2009): Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res* 88, 1026-30.
- ✓ Smahi, A., Courtois, G., Rabia, S. H., Doffinger, R., Bodemer, C., Munnich, A., Casanova, J. L., and Israel, A. (2002): The NF-kappaB signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum Mol Genet* 11, 2371-5.
- ✓ Smale, S. T. (2011): Hierarchies of NF-kappaB target-gene regulation. *Nat Immunol* 12, 689-94.
- ✓ Smith, D. J., Anderson, J. M., King, W. F., van Houte, J., and Taubman, M. A. (1993): Oral streptococcal colonization of infants. *Oral Microbiol Immunol* 8, 1-4.
- ✓ Smith, K., McCoy, K. D., and Macpherson, A. J. (2007): Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol* 19, 59-69.
- ✓ Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L. G., Gratadoux, J. J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J. P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H. M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., and Langella, P. (2008): *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16731-6.
- ✓ Son, Y. H., Jeong, Y. T., Lee, K. A., Choi, K. H., Kim, S. M., Rhim, B. Y., and Kim, K. (2008): Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 51, 71-7.
- ✓ Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C. H., Westover, B. P., Weatherford, J., Buhler, J. D., and Gordon, J. I. (2005): Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 307, 1955-9.
- ✓ Sougioultzis, S., Simeonidis, S., Bhaskar, K. R., Chen, X., Anton, P. M., Keates, S., Pothoulakis, C., and Kelly, C. P. (2006): *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 69-76.
- ✓ Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V., and Gordon, J. I. (2002): Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15451-5.
- ✓ Steenholdt, C., Andresen, L., Pedersen, G., Hansen, A., and Brynskov, J. (2009): Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 44, 195-204.

- ✓ Steinbrecher, K. A., Harmel-Laws, E., Sitcheran, R., and Baldwin, A. S. (2008): Loss of epithelial RelA results in deregulated intestinal proliferative/apoptotic homeostasis and susceptibility to inflammation. *J Immunol* 180, 2588-99.
- ✓ Steinman, L. (2008): A rush to judgment on Th17. *J Exp Med* 205, 1517-22.
- ✓ Stetson, D. B., Voehringer, D., Grogan, J. L., Xu, M., Reinhardt, R. L., Scheu, S., Kelly, B. L., and Locksley, R. M. (2004): Th2 cells: orchestrating barrier immunity. *Adv Immunol* 83, 163-89.
- ✓ Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006): Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6, 9-20.
- ✓ Suau, A. (2003): Molecular tools to investigate intestinal bacterial communities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37, 222-4.
- ✓ Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X. N., Kubo, C., and Koga, Y. (2004): Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558, 263-75.
- ✓ Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., and Koga, Y. (1997): The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 159, 1739-45.
- ✓ Sun, S. C. (2008): Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol* 8, 501-11.
- ✓ Sun, S. C. (2010): CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ* 17, 25-34.
- ✓ Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., and Greene, W. C. (1993): NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912-5.
- ✓ Suzuki, M., Hisamatsu, T., and Podolsky, D. K. (2003): Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun* 71, 3503-11.
- ✓ Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J. M., Wesche, H., Ohashi, P. S., Mak, T. W., and Yeh, W. C. (2002): Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750-6.
- ✓ Swantek, J. L., Tsen, M. F., Cobb, M. H., and Thomas, J. A. (2000): IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 164, 4301-6.

## T

- ✓ Tabeta, K., Yamazaki, K., Akashi, S., Miyake, K., Kumada, H., Umemoto, T., and Yoshie, H. (2000): Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 68, 3731-5.
- ✓ Tagg, J. R., and Dierksen, K. P. (2003): Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. *Trends Biotechnol* 21, 217-23.

- ✓ Tahk, S., Liu, B., Chernishof, V., Wong, K. A., Wu, H., and Shuai, K. (2007): Control of specificity and magnitude of NF-kappa B and STAT1-mediated gene activation through PIASy and PIAS1 cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11643-8.
- ✓ Takeuchi, O., and Akira, S. (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-20.
- ✓ Tamura, S., Yonezawa, H., Motegi, M., Nakao, R., Yoneda, S., Watanabe, H., Yamazaki, T., and Senpuku, H. (2009): Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 24, 152-61.
- ✓ Tang, E. D., Wang, C. Y., Xiong, Y., and Guan, K. L. (2003): A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 278, 37297-305.
- ✓ Tanzer, J. M., Kurasz, A. B., and Clive, J. (1985): Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R. *Infect Immun* 48, 44-50.
- ✓ Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., Ugarte, E., Munoz-Tamayo, R., Paslier, D. L., Nalin, R., Dore, J., and Leclerc, M. (2009): Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 11, 2574-84.
- ✓ Taverniti, V., Minuzzo, M., Arioli, S., Junttila, I., Hamalainen, S., Turpeinen, H., Mora, D., Karp, M., Pesu, M., and Guglielmetti, S. (2012): In vitro functional and immunomodulatory properties of the *Lactobacillus helveticus* MIMLh5/*Streptococcus salivarius* ST3 association relevant for the development of a pharyngeal probiotic product. *Appl Environ Microbiol* 2012, 13.
- ✓ Taylor, B. C., Zaph, C., Troy, A. E., Du, Y., Guild, K. J., Comeau, M. R., and Artis, D. (2009): TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med* 206, 655-67.
- ✓ Teughels, W., Kinder Haake, S., Sliepen, I., Pauwels, M., Van Eldere, J., Cassiman, J. J., and Quirynen, M. (2007a): Bacteria interfere with *A. actinomycetemcomitans* colonization. *J Dent Res* 86, 611-7.
- ✓ Teughels, W., Newman, M. G., Coucke, W., Haffajee, A. D., Van Der Mei, H. C., Haake, S. K., Schepers, E., Cassiman, J. J., Van Eldere, J., van Steenberghe, D., and Quirynen, M. (2007b): Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. *J Dent Res* 86, 1078-82.
- ✓ Tien, M. T., Girardin, S. E., Regnault, B., Le Bourhis, L., Dillies, M. A., Coppee, J. Y., Bourdet-Sicard, R., Sansonetti, P. J., and Pedron, T. (2006): Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 176, 1228-37.
- ✓ Tooley, K. L., Howarth, G. S., Lymn, K. A., Lawrence, A., and Butler, R. N. (2011): Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* does not affect mucositis severity or tumor progression in the tumor-bearing rat. *Cancer Biol Ther* 12, 131-8.
- ✓ Toualbi-Abed, K., Daniel, F., Guller, M. C., Legrand, A., Mauriz, J. L., Mauviel, A., and Bernuau, D. (2008): Jun D cooperates with p65 to activate the proximal kappaB site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. *Carcinogenesis* 29, 536-43.
- ✓ Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A., and Mosialos, G. (2003): CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 424, 793-6.

- ✓ Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., and Gordon, J. I. (2006): An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-31.

## U

- ✓ Umezawa, K., Ariga, A., and Matsumoto, N. (2000): Naturally occurring and synthetic inhibitors of NF-kappaB functions. *Anticancer Drug Des* 15, 239-44.
- ✓ Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D., and Aderem, A. (1999): Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14459-63.

## V

- ✓ Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L., and Hooper, L. V. (2008): Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20858-63.
- ✓ Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009): Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693-733.
- ✓ Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P. H., Keats, J. J., Wang, H., Vignali, D. A., Bergsagel, P. L., and Karin, M. (2008): Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 9, 1364-70.
- ✓ Vamadevan, A. S., Fukata, M., Arnold, E. T., Thomas, L. S., Hsu, D., and Abreu, M. T. (2009): Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun* 16, 93-103.
- ✓ Van Der Waaij, D., Berghuis-de Vries, J. M., and Lekkerkerk, L.-v. (1971): Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)* 69, 405-11.
- ✓ Vant Veer, C., van den Pangaart, P. S., van Zoelen, M. A., de Kruif, M., Birjmohun, R. S., Stroes, E. S., de Vos, A. F., and van der Poll, T. (2007): Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *J Immunol* 179, 7110-20.
- ✓ Venturi, A., Gionchetti, P., Rizzello, F., Johansson, R., Zucconi, E., Brigidi, P., Matteuzzi, D., and Campieri, M. (1999): Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 13, 1103-8.
- ✓ Vereecke, L., Sze, M., Mc Guire, C., Rogiers, B., Chu, Y., Schmidt-Supprian, M., Pasparakis, M., Beyaert, R., and van Loo, G. (2010): Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *J Exp Med* 207, 1513-23.
- ✓ Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. (1995): Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9, 2723-35.

- ✓ Vijay-Kumar, M., Sanders, C. J., Taylor, R. T., Kumar, A., Aitken, J. D., Sitaraman, S. V., Neish, A. S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I. R., and Gewirtz, A. T. (2007): Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* 117, 3909-21.
- ✓ Volman, J. J., Mensink, R. P., Buurman, W. A., Onning, G., and Plat, J. (2009): The absence of functional dectin-1 on enterocytes may serve to prevent intestinal damage. *Eur J Gastroenterol Hepatol*.
- ✓ Voltan, S., Martines, D., Elli, M., Brun, P., Longo, S., Porzionato, A., Macchi, V., D'Inca, R., Scarpa, M., Palu, G., Sturniolo, G. C., Morelli, L., and Castagliuolo, I. (2008): Lactobacillus crispatus M247-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor-gamma in the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 135, 1216-27.

## W

- ✓ Wagner, S., Carpentier, I., Rogov, V., Kreike, M., Ikeda, F., Lohr, F., Wu, C. J., Ashwell, J. D., Dotsch, V., Dikic, I., and Beyaert, R. (2008): Ubiquitin binding mediates the NF-kappaB inhibitory potential of ABIN proteins. *Oncogene* 27, 3739-45.
- ✓ Wald, D. (2003): SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunol.* 4, 920-927.
- ✓ Wallace, J. L., MacNaughton, W. K., Morris, G. P., and Beck, P. L. (1989): Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 96, 29-36.
- ✓ Walls, T., Power, D., and Tagg, J. (2003): Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by the normal flora of the nasopharynx: potential to protect against otitis media? *J Med Microbiol* 52, 829-33.
- ✓ Wan, Y. Y., Chi, H., Xie, M., Schneider, M. D., and Flavell, R. A. (2006): The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat Immunol* 7, 851-8.
- ✓ Wang, D., Westerheide, S. D., Hanson, J. L., and Baldwin, A. S., Jr. (2000): Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem* 275, 32592-7.
- ✓ Wang, L., Walia, B., Evans, J., Gewirtz, A. T., Merlin, D., and Sitaraman, S. V. (2003): IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol* 171, 3194-201.
- ✓ Wang, Y., Chan, S., and Tsang, B. K. (2002): Involvement of inhibitory nuclear factor-kappaB (NFkappaB)-independent NFkappaB activation in the gonadotropic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis expression during ovarian follicular development in vitro. *Endocrinology* 143, 2732-40.
- ✓ Wang, Y., Rickman, B. H., Poutahidis, T., Schlieper, K., Jackson, E. A., Erdman, S. E., Fox, J. G., and Horwitz, B. H. (2008): c-Rel is essential for the development of innate and T cell-induced colitis. *J Immunol* 180, 8118-25.
- ✓ Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., and Strober, W. (2004): NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 5, 800-8.
- ✓ Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., Wakatsuki, Y., Fuss, I. J., and Strober, W. (2006): Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity* 25, 473-85.

- ✓ Weil, R., Whiteside, S. T., and Israel, A. (1997): Control of NF-kappa B activity by the I kappa B beta inhibitor. *Immunobiology* 198, 14-23.
- ✓ Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. (2001): Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2, 346-52.
- ✓ Wertz, I. E., and Dixit, V. M. (2010): Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003350.
- ✓ Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., Ma, A., Koonin, E. V., and Dixit, V. M. (2004): De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430, 694-9.
- ✓ Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C. J., Stark, G. R., and Cao, Z. (1999): IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 274, 19403-10.
- ✓ Wescombe, P. A., Burton, J. P., Cadieux, P. A., Klesse, N. A., Hyink, O., Heng, N. C., Chilcott, C. N., Reid, G., and Tagg, J. R. (2006): Megaplasmids encode differing combinations of lantibiotics in *Streptococcus salivarius*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90, 269-80.
- ✓ West, A. P., Koblansky, A. A., and Ghosh, S. (2006): Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 409-37.
- ✓ Westerheide, S. D., Mayo, M. W., Anest, V., Hanson, J. L., and Baldwin, A. S., Jr. (2001): The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition. *Mol Cell Biol* 21, 8428-36.
- ✓ Whiteside, S. T., Epinat, J. C., Rice, N. R., and Israel, A. (1997): I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J* 16, 1413-26.
- ✓ Wietek, C., Cleaver, C. S., Ludbrook, V., Wilde, J., White, J., Bell, D. J., Lee, M., Dickson, M., Ray, K. P., and O'Neill, L. A. (2006): IkappaB kinase epsilon interacts with p52 and promotes transactivation via p65. *J Biol Chem* 281, 34973-81.
- ✓ Wirth, K. A., Bowden, G. H., Kirchherr, J. L., Richmond, D. A., Sheridan, M. J., and Cole, M. F. (2008): Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: evidence that *Streptococcus mitis* biovar 1 colonization induces strain-specific salivary immunoglobulin A antibodies. *Isme J* 2, 728-38.
- ✓ Wu, C., and Ghosh, S. (2003): Differential phosphorylation of the signal-responsive domain of I kappa B alpha and I kappa B beta by I kappa B kinases. *J Biol Chem* 278, 31980-7.

## X

- ✓ Xiao, G., Fong, A., and Sun, S. C. (2004): Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 30099-105.
- ✓ Xiao, G., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (2001): NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7, 401-9.
- ✓ Xiao, H., Gulen, M. F., Qin, J., Yao, J., Bulek, K., Kish, D., Altuntas, C. Z., Wald, D., Ma, C., Zhou, H., Tuohy, V. K., Fairchild, R. L., de la Motte, C., Cua, D., Vallance, B. A.,

and Li, X. (2007): The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity* 26, 461-75.

- ✓ Xu, J., and Gordon, J. I. (2003): Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10452-9.
- ✓ Xu, W. (2007): Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nature Immunol.* 8, 294-303.

## Y

- ✓ Yamamoto, M., and Takeda, K. (2008): Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses. *J Infect Chemother* 14, 265-9.
- ✓ Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., and Akira, S. (2004): Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* 430, 218-22.
- ✓ Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., and Gaynor, R. B. (2003): Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 423, 655-9.
- ✓ Yamamoto, Y., Yin, M. J., Lin, K. M., and Gaynor, R. B. (1999): Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 274, 27307-14.
- ✓ Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., and Israel, A. (1998): Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93, 1231-40.
- ✓ Yan, C., Wang, H., Aggarwal, B., and Boyd, D. D. (2004): A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF-kappaB motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. *Faseb J* 18, 540-1.
- ✓ Yan, F., and Polk, D. B. (2010): Disruption of NF-kappaB signalling by ancient microbial molecules: novel therapies of the future? *Gut* 59, 421-6.
- ✓ Yang, X. D., Huang, B., Li, M., Lamb, A., Kelleher, N. L., and Chen, L. F. (2009): Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit. *Embo J* 28, 1055-66.
- ✓ Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., and Sher, A. (2005): TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-9.
- ✓ Yeh, W. C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D. V., and Mak, T. W. (1997): Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7, 715-25.
- ✓ Yin, M. J., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (1998): The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396, 77-80.

## Z

- ✓ Zaki, M. H., Boyd, K. L., Vogel, P., Kastan, M. B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T. D. (2010): The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 32, 379-91.

- ✓ Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997): The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91, 243-52.
- ✓ Zaph, C., Troy, A. E., Taylor, B. C., Berman-Booty, L. D., Guild, K. J., Du, Y., Yost, E. A., Gruber, A. D., May, M. J., Greten, F. R., Eckmann, L., Karin, M., and Artis, D. (2007): Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 446, 552-6.
- ✓ Zaura, E., Keijser, B. J., Huse, S. M., and Crielaard, W. (2009): Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 9, 259.
- ✓ Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A., and Ghosh, S. (2004): A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-6.
- ✓ Zhang, G., and Ghosh, S. (2002): Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 277, 7059-65.
- ✓ Zhang, J., Stirling, B., Temmerman, S. T., Ma, C. A., Fuss, I. J., Derry, J. M., and Jain, A. (2006): Impaired regulation of NF-kappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. *J Clin Invest* 116, 3042-9.
- ✓ Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., and Neu, J. (2005): Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 135, 1752-6.
- ✓ Zhang, L., Sun, J., Li, D., Xiao, X. R., Zhu, Z., Gong, Q. M., and Zhou, H. M. (2011): [The antagonistic effect of the oral *Streptococcus* on the *Saccharomyces albicans* in vitro]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 29, 302-5.
- ✓ Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998): Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1, 661-71.
- ✓ Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W., and Dixit, V. M. (2004): Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 427, 167-71.
- ✓ Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., and De Vos, W. M. (1998): Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64, 3854-9.