



**HAL**  
open science

# Rôle du peptidoglycane et du récepteur NOD2 dans les capacités immunorégulatrices des lactobacilles

Elise Macho Fernandez

► **To cite this version:**

Elise Macho Fernandez. Rôle du peptidoglycane et du récepteur NOD2 dans les capacités immunorégulatrices des lactobacilles. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S005 . tel-00635082

**HAL Id: tel-00635082**

**<https://theses.hal.science/tel-00635082>**

Submitted on 24 Oct 2011

**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.

**Université du Droit et de la Santé de Lille II**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II**

**Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire**

Présentée et soutenue publiquement par

**Élise MACHO FERNANDEZ**

le 4 Mai 2011

**Rôle du peptidoglycane et du récepteur NOD2  
dans les capacités immunorégulatrices des lactobacilles**

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur <b>Michel SIMONET</b>	Président
Madame le Professeur <b>Marie-José BUTEL</b>	Rapporteur
Monsieur le Docteur <b>Jean-Marc CHATEL</b>	Rapporteur
Monsieur le Professeur <b>Pierre DESREUMAUX</b>	Examineur
Monsieur le Docteur <b>Ivo GOMPERTS BONECA</b>	Examineur
Madame le Docteur <b>Florence VELGE-ROUSSEL</b>	Examineur
Monsieur le Docteur <b>Guillaume DALMASSO</b>	Examineur
Madame le Docteur <b>Corinne GRANGETTE</b>	Directeur de thèse

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie le Professeur Michel Simonet de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Merci pour votre grande disponibilité et votre écoute. Je vous remercie également de m'avoir donné la chance de participer aux enseignements de microbiologie à la Faculté de médecine Henri Warembourg.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Marie-José Butel et au Docteur Jean-Marc Chatel qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Professeur Pierre Desreumaux, le Docteur Florence Velge-Roussel et le Docteur Guillaume Dalmaso d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le Docteur Ivo Boneca pour sa contribution à la réalisation de ce travail et pour son accueil chaleureux et sa disponibilité lors de mes manips à Paris. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie le Docteur Corinne Granette pour m'avoir accueillie en master 2 recherche et de m'avoir confié un projet aussi intéressant. Merci de la confiance et de la liberté que tu m'as accordées pendant ces quatre années.

Je remercie le Professeur Bruno Pot de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet. Plus particulièrement Véronique Valenti qui m'a été d'une aide très précieuse ; merci beaucoup Véro, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi.

Je remercie bien sur toute l'équipe « BLIM » et nos voisins les « PYP » pour leur accueil, en particulier Benoît, Joëlle, Jérôme, François et Angeline pour leur soutien, leur gentillesse et leur bonne humeur.

Sans oublier les anciens Stéphane, Sonia, Julien et Caroline pour leur disponibilité et les bons moments que l'on a passés ensemble.

Un très grand merci à Laurye et Delphine, ma « famille du labo », avec qui j'ai partagé de merveilleux moments en cédille et en dehors. Merci à vous deux pour votre présence, votre soutien et votre amitié.

Je remercie également le professeur René Courcol, Nadine, Pascale et Annabelle de m'avoir fait découvrir l'enseignement supérieur. Travailler à vos côtés a été une expérience très enrichissante.

Je souhaite également remercier Marie-Christine et Véronique du secrétariat ainsi que le personnel de l'animalerie, plus particulièrement Marie-Christine et Thierry pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je terminerai par un immense merci à ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée dans mes choix.

## Principales abréviations

BMDC : Cellule dendritique dérivée de moelle osseuse (bone marrow-derived dendritic cell)  
CARD : Caspase recruitment domain  
CD : Cluster de différenciation  
CFU : Colony forming unit  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
DC : Cellule dendritique  
DSS : Dextran sodium sulfate  
FAE : Follicule lymphoïde associé à l'épithélium (follicle-associated epithelium)  
GALT : Tissu lymphoïde associé à l'intestin (gut-associated lymphoid tissue)  
GlcNAc : N-acétylglucosamine  
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase  
IFN : Interféron  
Ig : Immunoglobuline  
I $\kappa$ B : Inhibitor of NF- $\kappa$ B  
IL : Interleukine  
IRAK : Interleukin-1 receptor-associated kinase  
IRF : Interferon regulatory factor  
LPS : Lipopolysaccharide  
LRR : Leucine-rich repeat  
LTA : Acide lipotéichoïque  
Mal : MyD88 adaptor like protein  
MAMP : Microbial-associated molecular pattern  
MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
MDC : Monocyte-derived dendritic cell  
MDP : Muramyl dipeptide  
*meso*-DAP : Acide *meso*-diaminopimélique  
MurNAc : Acide N-acétylmuramique  
MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88  
NLN : Ganglion mésentérique (mesenteric lymph node)  
NF- $\kappa$ B : Nuclear factor- $\kappa$ B  
NLR : NOD-like receptor  
NOD : Nucleotide-binding oligomerization domain  
PBMC : Cellule mononucléée de sang périphérique  
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde  
PGN : Peptidoglycane  
PRR : Pattern recognition receptor  
SCID : Severe combined immunodeficiency disorder  
TCR : T cell receptor  
TGF : Transforming growth factor  
Th : T helper  
TIR : Toll/IL-1R interaction domain  
TIRAP : TIR domain-containing adaptor protein  
TLR : Toll-like receptor  
TNBS : Acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique  
TNF : Tumor necrosis factor  
TRAF : TNF $\alpha$ -receptor-associated factor  
TRAM : TRIF-related adaptor molecule  
Treg : Cellule T régulatrice  
TRIF : TIR domain-containing adaptor inducing interferon  $\beta$   
TSLP : Thymic stromal lymphopoietin

## Résumé

D'étiologie inconnue, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, telles que la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, semblent résulter d'une réaction immunitaire inappropriée vis-à-vis du microbiote intestinal chez des individus génétiquement prédisposés. De ce fait, la modulation du microbiote par des probiotiques, majoritairement des bactéries lactiques commensales (lactobacilles et bifidobactéries), représente une alternative thérapeutique intéressante et a déjà conduit à un certain nombre d'essais cliniques concluants. Cependant, les effets thérapeutiques des bactéries probiotiques se sont avérés spécifiques de la souche utilisée et les mécanismes d'action de ces micro-organismes restent encore méconnus.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle du peptidoglycane et de la voie de signalisation NOD2 dans les capacités anti-inflammatoires de certains lactobacilles probiotiques.

Dans un modèle murin de colite expérimentale mimant la pathologie humaine, nous avons tout d'abord montré que les capacités protectrices de la souche anti-inflammatoire *Lactobacillus salivarius* Ls33 nécessitent la présence du récepteur NOD2. Ce récepteur reconnaissant les produits de dégradation du peptidoglycane, nous avons préparé du peptidoglycane hautement purifié de la souche Ls33 et montré que l'administration de ce composant, par voie intrapéritonéale ou orale, protège les souris de la colite expérimentale. Nous avons également mis en évidence que l'effet protecteur du peptidoglycane de Ls33 implique la production d'IL-10, la voie immunosuppressive de l'indoléamine 2,3-dioxygénase et le développement, au sein des ganglions mésentériques, de cellules dendritiques régulatrices CD103<sup>+</sup> et de cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Nous avons montré que le peptidoglycane de Ls33 favorise, *in vitro*, la différenciation de cellules dendritiques naïves en cellules dendritiques productrices d'IL-10, capables de protéger, après transfert adoptif, les souris de la colite de façon NOD2-dépendante. Les capacités protectrices n'ayant pas été obtenues avec le peptidoglycane de la souche non anti-inflammatoire *L. acidophilus* NCFM, nous avons ensuite réalisé une analyse structurale des deux peptidoglycanes. Alors que les deux souches arborent le muropeptide M-tri-Lys-D-Asn, nous avons identifié un muropeptide additionnel libéré uniquement par Ls33, le M-tri-Lys. Bien que les deux muropeptides synthétiques activent NOD2 *in vitro*, seule l'administration systémique du M-tri-Lys protège les souris de la colite. Cette protection est dépendante du récepteur NOD2 mais ne nécessite pas la présence de l'adaptateur principal des récepteurs de type Toll ou TLR, MyD88.

En conclusion, nos résultats indiquent que le peptidoglycane et certains de ses dérivés sont des composants actifs dans la fonctionnalité des lactobacilles probiotiques et représentent une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

## Abstract

In genetically susceptible individuals, an inappropriate mucosal immune response against the intestinal microbiota appears to be the principal mechanism leading to the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (including Crohn's disease and ulcerative colitis). Therefore, modulation of the luminal contents with probiotics, mainly represented by commensal lactic acid bacteria (lactobacilli and bifidobacteria), represents an attractive therapeutic alternative and has already led to successful clinical trials. However, the protective effect of probiotic bacteria clearly depends on the strains used and the precise mechanisms of action of these microorganisms are still unknown.

In this study, we investigated the role of peptidoglycan and NOD2 signalling in the anti-inflammatory capacity of selected probiotic lactobacilli.

In a mouse model of experimental colitis mimicking human pathology, we first showed that the protective capacity of the anti-inflammatory strain *Lactobacillus salivarius* Ls33 require NOD2 signalling. Since this receptor senses peptidoglycan degradation products, we prepared highly purified peptidoglycan from Ls33 and showed that systemic as well as oral administration of this component was able to rescue mice from experimental colitis. We also demonstrated that the protective effect of Ls33 peptidoglycan involved the production of IL-10, the immunosuppressive indoleamine 2,3-dioxygenase pathway and the expansion of regulatory CD103<sup>+</sup> dendritic cells and CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells within mesenteric lymph nodes. Furthermore, we showed that the IL-10-producing dendritic cells induced by Ls33 peptidoglycan *in vitro* were able to protect mice from colitis in a NOD2-dependent manner after adoptive transfer.

Since the observed anti-inflammatory properties were not obtained with peptidoglycan derived from the non-anti-inflammatory strain *L. acidophilus* NCFM, we conducted a structural analysis of the two peptidoglycans. While the two strains exhibited the M-tri-Lys-D-Asn muropeptide, we identified an additional muropeptide released exclusively by Ls33, the M-tri-Lys. Although both synthetic muropeptides activated NOD2 *in vitro*, only systemic administration of M-tri-Lys protects mice from colitis. This protective effect was NOD2-dependent but did not require the presence of MyD88, the main adapter used by Toll-like receptors.

In conclusion, our results indicate that purified peptidoglycan and specific derived muropeptides are active components in probiotic lactobacilli functionality and represent a new therapeutic strategy for treating inflammatory bowel diseases.

# INTRODUCTION

# Chapitre 1 : Structure et fonction du système immunitaire intestinal

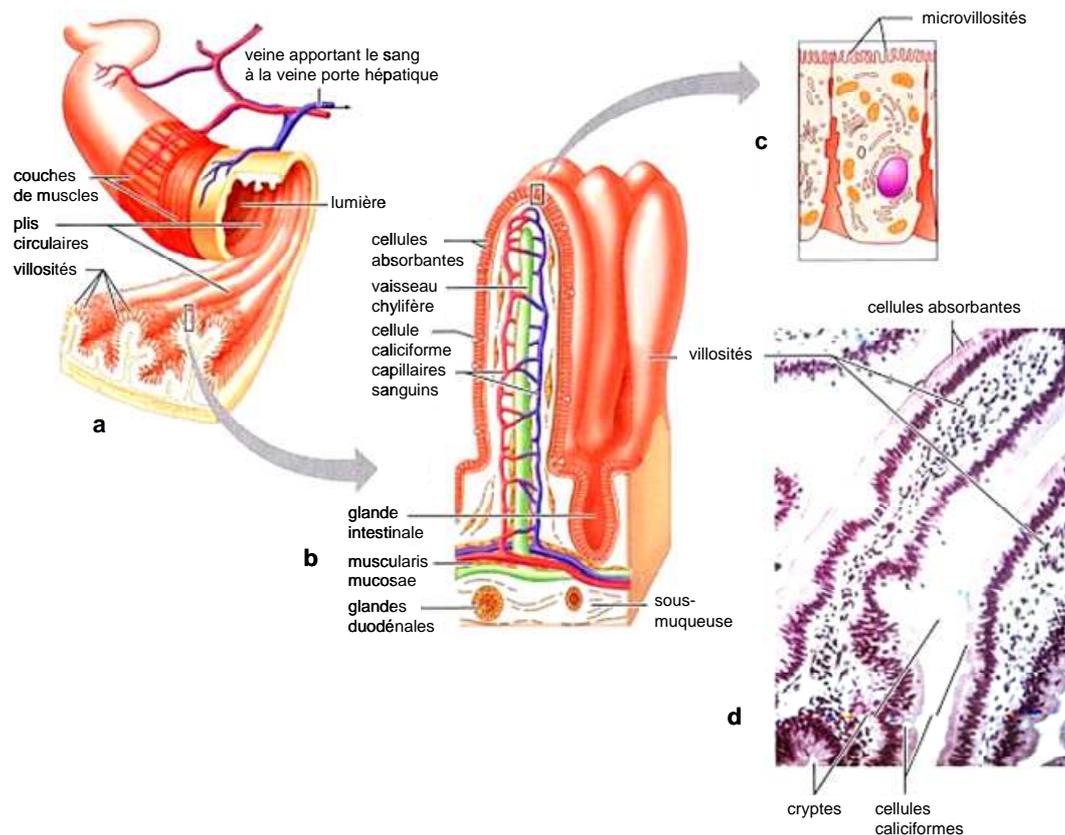
## I. Anatomie du tube digestif et de la muqueuse intestinale

Avec une surface estimée entre 200 et 300 m<sup>2</sup> chez l'homme, la muqueuse intestinale est la plus grande interface entre l'organisme et l'environnement extérieur. Bien qu'elle représente une porte d'entrée pour les micro-organismes pathogènes, sa fonction principale est de favoriser la digestion et l'absorption des nutriments.

La partie inférieure du tractus digestif se compose principalement de deux parties : l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle, la partie proximale de l'intestin faisant suite à l'estomac, comprend le duodénum, le jéjunum et l'iléon alors que le gros intestin est constitué par le caecum, le côlon et le rectum.

La paroi intestinale comprend différentes tuniques réparties de la lumière intestinale vers la séreuse (Figure 1) : la muqueuse constituée d'un épithélium unistratifié et d'un tissu conjonctif appelé chorion ou *lamina propria*, la sous-muqueuse, la musculature composée d'une première couche de tissu musculaire lisse circulaire puis d'une couche de tissu musculaire lisse longitudinale et la séreuse. La muqueuse de l'intestin grêle présente des villosités qui se projettent dans la lumière intestinale et des invaginations, appelées cryptes ou glandes de Lieberkühn, s'intercalant entre les villosités. Absentes au niveau du gros intestin, les villosités favorisent l'absorption des nutriments et sont constituées de différents types cellulaires provenant de la différenciation de cellules souches multipotentes présentes au fond des cryptes.

L'épithélium intestinal est constitué principalement des cellules épithéliales polarisées (entérocytes) assurant la fonction d'absorption des nutriments grâce à la présence, à leur pôle apical, de microvillosités riches en enzymes de digestion comme les hydrolases et en transporteurs. Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées et forment ainsi une barrière physique entre le corps et le contenu luminal. Retrouvées plus abondamment dans l'intestin distal, les cellules caliciformes de Goblet ont pour fonction de sécréter par exocytose dans la lumière intestinale le mucus, un revêtement protecteur des muqueuses constitué d'une matrice de glycoprotéines et de glycolipides. Les rares cellules entéro-endocrines produisent des hormones telles que la sérotonine, la substance P et la sécrétine (Hocker and Wiedenmann, 1998). Ces trois types cellulaires sont renouvelés par un mécanisme de différenciation et de migration, de la crypte au sommet de la villosité, assez rapide (2 à 5 jours). Au contraire, les cellules de Paneth, spécialisées dans la production de peptides anti-microbiens tels que le lysozyme, la phospholipase A2, les  $\alpha$ - et  $\beta$ -défensines et la lectine RegIII $\gamma$  (Brandl et al., 2007; Keshav, 2006; Salzman et al., 2007), restent localisées à la base des cryptes et se renouvellent tous les 20 jours.



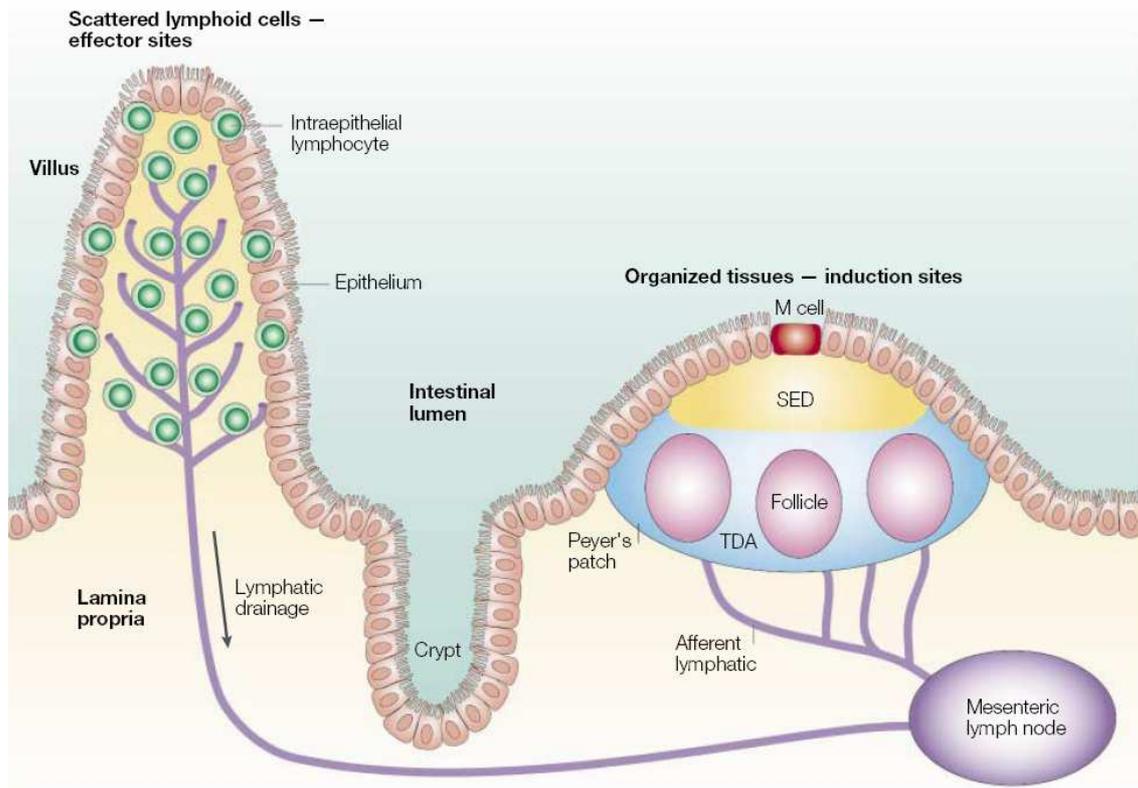
**Figure 1 : Anatomie de l'intestin.**

- a) Structure générale de l'intestin grêle
  - b) Représentation schématique d'une villosité
  - c) Entérocyte présentant des villosités au niveau apical
  - d) Coupe histologique de la muqueuse de l'intestin grêle montrant les villosités (x 300).
- D'après Marieb EN, Editions De boeck Université 1999.

## II. Le système lymphoïde associé à l'intestin

Le système lymphoïde associé à l'intestin (GALT, gut-associated lymphoïd tissue) représente la partie la plus importante et la plus complexe du système immunitaire. En contact permanent avec les antigènes du non soi, il doit discriminer les antigènes alimentaires et du microbiote des agents potentiellement pathogènes.

Schématiquement, le GALT peut être divisé en sites inducteurs et en sites effecteurs de la réponse immune reliés entre eux par le système lymphatique (Figure 2). Les sites inducteurs comprennent des formations lymphoïdes hautement organisées telles que les ganglions mésentériques (MLN, mesenteric lymph nodes), les follicules lymphoïdes isolés et les plaques de Peyer. Les sites effecteurs sont formés par les lymphocytes intra-épithéliaux dispersés le long de l'épithélium et les lymphocytes de la *lamina propria*.



**Figure 2 : Représentation schématique du système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale.**

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 la *lamina propria* des villosités sont drainées par des vaisseaux lymphatiques afférents conduisant aux ganglions mésentériques.

SED, dôme sous-épithélial ; TDA, zone dépendante du thymus

D'après Mowat AM, *Nature Reviews Immunology* 2003.

### A. Les plaques de Peyer

Les plaques de Peyer sont des structures lymphoïdes macroscopiques retrouvées au niveau de la sous-muqueuse de l'intestin grêle. Elles sont constituées d'une collection de follicules lymphoïdes formés d'une part un centre germinatif comprenant des lymphocytes B immatures qui se différencieront principalement en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines A (IgA) et d'autre part de zones interfolliculaires peuplées de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, présentant majoritairement un TCR  $\alpha\beta$ , et de cellules dendritiques (DC) interstitielles. On retrouve également d'autres populations de lymphocytes T : les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

Les follicules lymphoïdes sont séparés de la lumière intestinale par la région du dôme sous-épithélial qui est enrichie en lymphocytes B et T, en macrophages et en différentes sous-populations de DC. Ce dôme est recouvert d'une monocouche de cellules épithéliales cylindriques appelée épithélium associé aux follicules (FAE, follicle-associated epithelium) caractérisé par la présence de cellules M (microfold). Ces cellules spécialisées, dépourvues

de bordure en brosse au pôle apical, présentent une profonde invagination de leur membrane plasmique au niveau basolatéral qui forme une poche intra-épithéliale. Cette structure particulière favorise l'endocytose de micro-organismes, de macromolécules et d'antigènes particuliers de la lumière vers la muqueuse intestinale. Les cellules M, qui n'expriment pas ou peu les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), ne semblent pas capables d'apprêter les antigènes (Neutra et al., 1996). Cependant, elles favorisent le passage des antigènes vers les cellules présentatrices d'antigènes du dôme.

## **B. Les ganglions mésentériques**

Les vaisseaux lymphatiques afférents drainent l'épithélium et la *lamina propria* de l'intestin grêle et du côlon vers la chaîne de MLN organisée au niveau du tissu conjonctif du mésentère intestinal. Les MLN sont constitués d'un cortex comprenant des cellules B organisées en follicules lymphoïdes et d'une zone para-corticale ou medulla hébergeant les lymphocytes T et les DC. Les vaisseaux lymphatiques efférents quittent le ganglion au niveau de la medulla et drainent la lymphe jusqu'au canal thoracique avant de rejoindre la circulation systémique.

Afin d'être recrutés au sein des MLN, les lymphocytes T effecteurs doivent exprimer la molécule d'adhésion intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , qui interagit avec la molécule MADCAM1 (mucosal adressin cell-adhesion molecule 1) des cellules endothéliales des veinules post-capillaires du tissu intestinal (Berlin et al., 1995; Berlin et al., 1993), et le récepteur aux chimiokines CCR9. L'expression de ces deux molécules de domiciliation (molécules dites de « homing ») dépend de la présence d'acide rétinoïque et des cellules stromales des MLN (Gorfu et al., 2009; Hammerschmidt et al., 2008). Les MLN jouent également un rôle important dans la régulation des réponses humorales puisque l'ablation de ces organes lymphoïdes augmente la réponse IgA vis-à-vis d'antigènes oraux (Hahn et al., 2010).

## **III. Activation de la réponse immunitaire intestinale**

En contact permanent avec de nombreux micro-organismes pathogènes présents dans l'environnement, notre organisme doit mettre en place des réponses immunitaires appropriées afin de se protéger des infections. Ces réponses immunes sont assurées par l'action coordonnée des systèmes immunitaires inné et adaptatif. La réponse 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 lymphocytes T et B, permet l'élimination du pathogène et la mise en place d'une mémoire immunologique spécifique du pathogène rencontré.

## **A. Reconnaissance des antigènes microbiens**

Les réponses immunes sont initiées par la reconnaissance de motifs moléculaires conservés au sein des espèces microbiennes (MAMP, microbial-associated molecular pattern) par des récepteurs de l'immunité innée appelés PRR (pattern recognition receptor). Les quatre familles de PRR identifiées à ce jour comprennent des protéines transmembranaires comme les récepteurs de type Toll (TLR, Toll-Like Receptor) et les lectines de type C ainsi que des récepteurs cytoplasmiques tels que les récepteurs NOD (NLR, Nucleotide oligomerization domain-like receptor) et les récepteurs RIG-(Retinoic acide-inducible gene) I (RLR) reconnaissant les ARN double brin viraux. L'activation de ces récepteurs aboutit non seulement à la transcription de médiateurs inflammatoires (cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, interférons de type I, protéines anti-microbiennes) nécessaires à la défense de l'hôte mais aussi au développement d'une immunité adaptative spécifique (Kumar et al., 2009). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales et par les cellules présentatrices d'antigènes comme les DC et les macrophages.

### **1. Les récepteurs de type « Toll » ou TLR**

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires caractérisées par un domaine extracellulaire présentant un nombre varié de motifs répétés riches en leucine (domaine LRR, leucine-rich repeat), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique transducteur du signal présentant des homologies avec le récepteur à l'IL-1 (domaine TIR, Toll/IL-1R interaction domain) (Akira, 2001; Janeway and Medzhitov, 2002). A ce jour, dix TLR humains et treize TLR murins ont été identifiés. Bien que les TLR1 à 9 soient conservés entre les deux espèces, le TLR10 murin n'est pas fonctionnel et les TLR11, TLR12 et TLR13 ne sont pas retrouvés dans le génome humain. Des études menées chez des souris déficientes pour chacun de ces récepteurs ont montré que chaque TLR présente une fonction distincte en terme de reconnaissance de motifs microbiens et d'initiation de réponse immune (Akira, 2006).

#### **a. Les motifs bactériens reconnus par les TLR**

En fonction de leur localisation cellulaire, on distingue deux groupes de TLR : les TLR situés à la surface des cellules qui reconnaissent principalement les composants membranaires des micro-organismes (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11) et les TLR localisés exclusivement dans des vésicules intracellulaires (réticulum endoplasmique, endosomes, lysosomes et endolysosomes) qui détectent essentiellement les acides nucléiques microbiens (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9).

Le TLR2, initialement associé à la reconnaissance de composants de paroi de bactéries à Gram positif, le peptidoglycane et les acides lipotéichoïques (LTA) (Schwandner

et al., 1999), reconnaît également le lipoarabinomannane des mycobactéries (Underhill et al., 1999) et le LPS atypique de *Leptospira interrogans* (Werts et al., 2001). La formation d'hétérodimères TLR2-TLR1 et TLR2-TLR6 permet de discriminer, respectivement, les lipopeptides triacylés des bactéries à Gram négatif et les lipopeptides diacylés des bactéries à Gram positif (Jin et al., 2007; Kang et al., 2009). La reconnaissance du peptidoglycane par le TLR2 est cependant controversée (Voir chapitre 4).

Des expériences de clonage ont montré que les souris résistantes au lipopolysaccharide (LPS), un composant de la paroi des bactéries à Gram négatif responsable du choc septique, présentent une mutation dans un gène codant pour une molécule apparentée à Toll, appelée plus tard TLR4 (Poltorak et al., 1998). Le LPS est pris en charge par la molécule LBP (LPS binding protein) présente dans le sérum puis le complexe LPS-LBP se fixe au récepteur CD14. C'est ce complexe CD14-LPS-LBP qui est ensuite reconnu par le TLR4 associé avec la molécule MD2 (myeloid differentiation factor 2) (Akashi et al., 2001). Une étude cristallographique a révélé que deux complexes TLR4-MD2-LPS interagissent symétriquement pour former un homodimère (Park et al., 2009). Le TLR4 reconnaît également la pneumolysine, une toxine cytolytique produite par *Streptococcus pneumoniae* (Malley et al., 2003).

Le TLR5 reconnaît spécifiquement la flagelline, protéine structurale du flagelle bactérien (Hayashi et al., 2001) et le TLR11, présent uniquement chez la souris, détecte les bactéries uropathogènes et une molécule de type profiline provenant du parasite *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky et al., 2005; Zhang et al., 2004).

Le TLR3 reconnaît les ARN viraux double brin dans les endosomes (Alexopoulou et al., 2001) et est également impliqué dans la détection d'un homologue structural synthétique de l'ARN double brin, le poly I:C (polyinosinic polycytidylic acid). 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).

Les molécules TLR7 murines et TLR7/TLR8 humaines reconnaissent les ARN simple brin viraux (Heil et al., 2004) ainsi que des petites molécules puriques (imidazoquinolones). Le TLR7 reconnaît également l'ARN des Streptocoques du groupe B dans les endolysosomes des DC (Mancuso et al., 2009).

Le TLR9 reconnaît les motifs CpG non méthylés présents dans l'ADN bactérien (Hemmi et al., 2000).

Récepteurs	Co-récepteurs	Agonistes	Origine de l'agoniste
TLR1/TLR2	CD14	lipopeptides triacylés Pam <sub>3</sub> CysK <sub>4</sub>	bactéries à Gram négatif synthétique
TLR2/TLR6	CD14 CD36	lipopeptides diacylés acides lipotéichoïques zymosan	bactéries à Gram positif bactéries à Gram positif champignon
TLR2	CD14	lipoarabinomannane LPS atypique	mycobactéries <i>Leptospira interrogans</i>
TLR3	ND	ARN double brin Poly I :C	virus synthétique
TLR4	CD14 MD2	LPS pneumolysine	bactéries à Gram négatif <i>Streptococcus pneumoniae</i>
TLR5	ND	flagelline	bactéries
TLR7	ND	ARN simple brin ARN imidazoquinolines	virus streptocoques du groupe B synthétique
TLR8	ND	ARN simple brin imidazoquinolines	virus synthétique
TLR9	ND	ADN CpG non méthylé	bactéries
TLR10	ND	ND	ND
TLR11	ND	ND molécule de type profiline	bactéries uropathogènes <i>Toxoplasma gondii</i>

**Tableau 1 : Les principaux co-récepteurs et agonistes des TLR.**

Selon leur localisation cellulaire, les TLR vont détecter des ligands de nature différente. Les TLR insérés dans la membrane plasmique (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11) reconnaissent des molécules libérées ou exprimées à la surface des micro-organismes alors que les TLR présent au niveau des endosomes (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) vont reconnaître des acides nucléiques ou des molécules libérés après la dégradation des micro-organismes dans des vésicules intracellulaires (endosomes ou lysosomes).

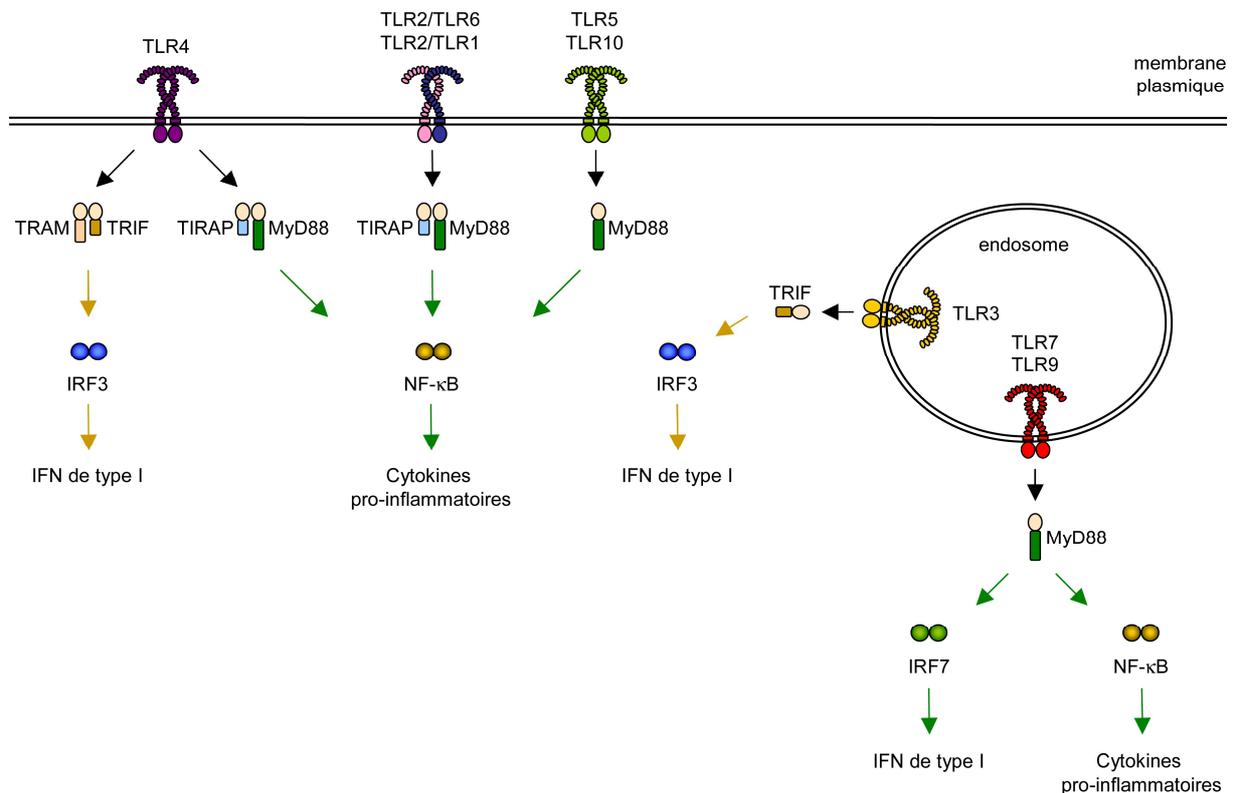
ND : non déterminé

### **b. Les voies de signalisation des TLR**

La reconnaissance des MAMP par les TLR aboutit à la transcription de différents gènes en fonction du TLR et du type cellulaire impliqués. La différence entre la nature des cascades de signalisations induites par chaque TLR peut être partiellement expliquée en fonction des molécules adaptatrices recrutées au niveau du domaine TIR (Akira, 2006). A ce jour, 5 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) pour l'initiation de la transduction du signal tandis que SARM (Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein) inhibe la signalisation dépendante de TRIF (O'Neill and Bowie, 2007) (Figure 3).

MyD88, l'adaptateur utilisé par tous les TLR sauf le TLR3, recrute et active les kinases IRAK-1 et IRAK-4 (IL-1R associated kinase 1 et 4) qui recrutent à leur tour TRAF6 (TNF $\alpha$  receptor-associated factor 6), une molécule qui couple les voies de transduction

aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa B) ou les Inteterferon-Regulatory Factor (IRF) IRF1, IRF5 et IRF7. Indépendamment de son recrutement par les TLR, la molécule MyD88 contribue également à des voies de signalisation activées par les cytokines IL-1, IL-18 et IFN $\gamma$ . En plus de la voie MyD88, le TLR4 et le TLR3 peuvent également induire la production d'interféron de type I en recrutant l'adaptateur TRIF. Cette molécule active le facteur de transcription IRF3 qui se fixe sur le promoteur du gène de l'IFN $\beta$  (Takeuchi and Akira, 2010).



**Figure 3 : Les adaptateurs et voies de signalisation utilisés par les TLR.**

Après reconnaissance de leurs agonistes, les TLR recrutent différents adaptateurs qui initient les cascades de signalisation aboutissant à la production de cytokines inflammatoires ou d'interféron de type I. MyD88, l'adaptateur principal des TLR, est utilisé par tous les TLR excepté le TLR3 qui recrute l'adaptateur TRIF. TRIF est également utilisé par le TLR4. TRAM et TIRAP sont les adaptateurs accessoires de MyD88 et de TRIF. L'association MyD88-TIRAP participe à la signalisation du TLR4, du TLR2/TLR1 et du TLR2/TLR6 alors que le complexe TRIF-TRAM est utilisé par le TLR4.

TLR, Toll-like Receptor ; MyD88, facteur de différenciation myéloïde 88 ; TRIF, domaine TIR contenant un adaptateur induisant l'interféron  $\beta$  ; TIRAP, domaine TIR contenant une protéine adaptatrice ; TRAM, adaptateur apparenté à TRIF ; IRF, facteur régulant l'interféron ; IFN, interféron  
 Inspiré de *Kawai T & Akira S, Nature Immunology 2010.*

## 2. Les récepteurs cytosoliques de la famille des NOD-like receptors (NLR)

La famille des NLR est constituée de récepteurs intracellulaires caractérisés par la présence d'un domaine NOD conservé (Inohara and Nunez, 2001). L'architecture de ces récepteurs ressemble à celle d'un sous-ensemble de protéines de résistance aux maladies des plantes (protéines R). L'organisation générale des NLR comprend 1) une région C-terminale riche en LRR responsable de la reconnaissance de motifs microbiens conservés ; 2) un domaine central NOD (Nucleotide-binding oligomerisation domain) nécessaire pour la fixation des nucléotides et l'auto-oligomérisation ; et 3) un domaine N-terminal impliqué dans l'initiation de la signalisation et constitué de domaines d'interaction protéine-protéine tels que le domaine de recrutement des caspases (CARD), le domaine pyrine (PYD) et le domaine BIR (baculovirus inhibitor repeat). Des études bioinformatiques ont révélé la présence, dans le génome humain et murin respectivement, de 23 et de 34 gènes codant pour des NLR (Harton et al., 2002). Alors que certains NLR, tels que NOD1, NOD2, NAIP (NLR family, apoptosis inhibitory protein) et NLRC4 (NLR family CARD domain-containing protein 4) reconnaissent des motifs microbiens conservés, d'autres membres de cette famille comme NLRP1 et NLRP3 détectent des « signaux de danger », des molécules ou composants xénogènes qui alertent le système immunitaire probablement indépendamment d'une infection microbienne (Tableau 2).

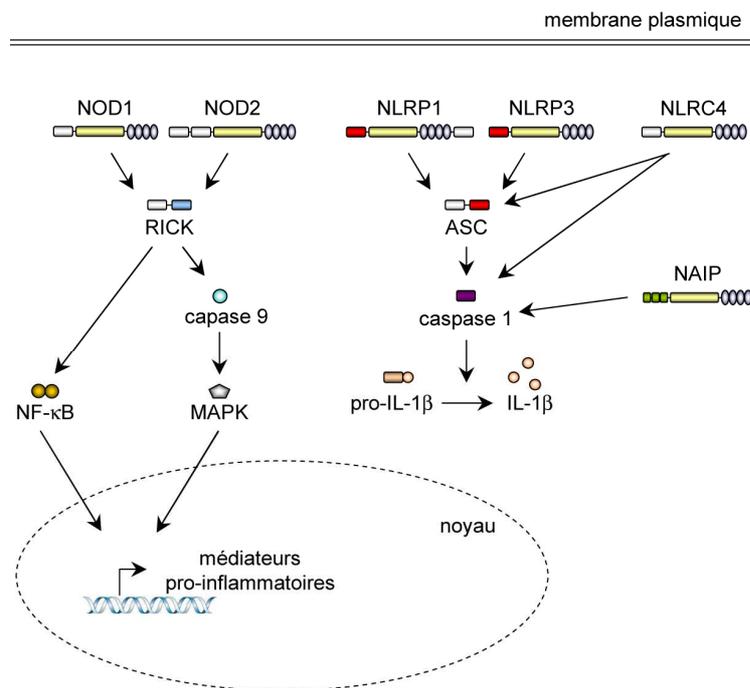
Récepteur humain / murin		Structure	Molécules détectées	Référence
NLRC4	IPAF		flagelline	Franchi L, 2006 ; Miao EA, 2006 Sutterwala FS, 2007 ; Amer AO, 2006
NAIP	NAIP			Ren T, 2006 ; Molofsky AB, 2006
NLRP1	NALP1		toxine létale de <i>Bacillus anthracis</i> faibles concentrations en potassium fragments du peptidoglycane (MDP)	Boyden ED and Dietrich WF, 2006 Petrilli V, 2007 Hsu LC, 2008
NLRP3	NALP3		ATP ARN double brin viral MDP acide urique faibles concentrations en potassium	Mariathasan S, 2006 Kanneganti TD, 2006 Martinon F, 2004 Martinon F, 2006 Petrilli V, 2007
NOD1	NOD1		fragments du peptidoglycane ( <i>meso</i> -DAP)	Girardin S, 2003 ; Chamailard M, 2003
NOD2	NOD2		fragments du peptidoglycane (MDP) ARN simple brin viral	Girardin S, 2003 ; Inohara N, 2003 Sabbah A, 2009

**Tableau 2 : Structure et principaux agonistes des NLR.**

Les NLR sont constitués d'une région C-terminale riche en leucine reconnaissant le ligand (○○○○), d'un domaine central NOD responsable de l'oligomérisation des récepteurs (▬▬▬▬) et d'une région N-terminale transductrice du signal (nature du domaine effecteur : □ CARD ■ PYD ■■■ BIR). Ces récepteurs sont activés après reconnaissance de motifs microbiens conservés ou par des signaux de danger.

MDP : muramyl dipeptide, *meso*-DAP : acide *meso*-diaminopimélique

Le modèle actuel propose que, suite à la reconnaissance des MAMP ou des signaux de danger par le domaine C-terminal, le récepteur subit des réarrangements conformationnels aboutissant à une oligomérisation via le domaine NOD. Puis, les domaines N-terminaux recrutent des molécules effectrices contenant des domaines CARD ou PYD (Inohara et al., 1999). Ainsi, les protéines NOD1 et NOD2 interagissent avec la sérine thréonine kinase RICK pour activer les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et MAPK (mitogen-activated protein kinase). D'autres NLR comme NLRP1 recrutent la protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) pour activer la caspase 1 qui sera recrutée par un complexe multi-protéique appelé inflammasome (Martinon et al., 2002).



#### Figure 4 : Les principales voies de signalisation des NLR.

Après reconnaissance de leurs agonistes, les NLR recrutent différentes molécules effectrices qui initient les cascades de signalisation aboutissant à la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire. NOD1 et NOD2 recrutent la kinase RICK afin d'activer les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et MAPK et la transcription de gènes pro-inflammatoires. L'activation de NLRP1, NLRP3, NLRC4 et NAIP aboutit à l'activation de la caspase 1 qui convertit le précurseur de l'IL-1 $\beta$  en cytokine mature qui sera ensuite sécrétée.

Inspiré de *Kanneganti TD et al, Immunity 2007.*

L'activation des récepteurs NOD1 et NOD2 après la reconnaissance de structures distinctes au sein du peptidoglycane bactérien, respectivement *meso*-DAP (acide *meso*-diaminopimélique) et MDP (muramyl dipeptide), est développée dans le chapitre 4.

## **B. Les cellules dendritiques intestinales, des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles**

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles faisant le lien entre l'immunité innée et adaptative en migrant des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter des antigènes aux lymphocytes T (Banchereau and Steinman, 1998). Cette migration des DC est observée en réponse à une stimulation inflammatoire mais également en condition physiologique. Ainsi, les DC migrent continuellement de l'intestin vers les MLN afin de maintenir de la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi et alimentaires (Huang et al., 2000; Worbs et al., 2006).

A l'état basal, les DC sont dans un état « immature » caractérisé par une grande capacité d'endocytose et de phagocytose permettant la capture d'antigènes et par la faible expression membranaire du CMH II et de molécules de co-stimulation. A la suite d'une infection microbienne ou d'un dommage tissulaire, les DC immatures migrent vers le site inflammatoire en réponse à la production d'un large spectre de chimiokines inflammatoires par les cellules épithéliales ou stromales résidentes. Après la détection des MAMP via les PRR (TLR, NLR, lectines) ou de signaux de danger tissulaires, les DC immatures vont acquérir un phénotype mature en perdant leurs capacités phagocytaires et en exprimant le CMH II et des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) nécessaires à l'activation des lymphocytes T. Ces DC matures migrent vers les organes lymphoïdes afin d'activer une réponse adaptative spécifique de l'antigène.

La muqueuse intestinale héberge de nombreuses DC dont la fonction est influencée par leur sous-type et l'environnement local. Ces cellules constituent en effet une famille hétérogène dont les sous-populations se distinguent en fonction de l'expression de marqueurs de surface, de leur distribution tissulaire et de leur fonction. Classiquement on distingue 2 grandes familles de DC : les DC conventionnelles (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). En produisant des interférons de type I, les pDC sont spécialisées dans les réponses immunes antivirales. Chez la souris, ces différentes familles de DC sont caractérisées par l'expression différentielle des marqueurs de surface intégrine  $\alpha$  (CD11c), CD8 $\alpha$  et CD11b.

## 1. Les sous populations de cellules dendritiques intestinales

Différentes sous-populations de DC ont été identifiées dans la *lamina propria* de l'intestin grêle et du côlon, dans les plaques de Peyer et dans les MLN du GALT.

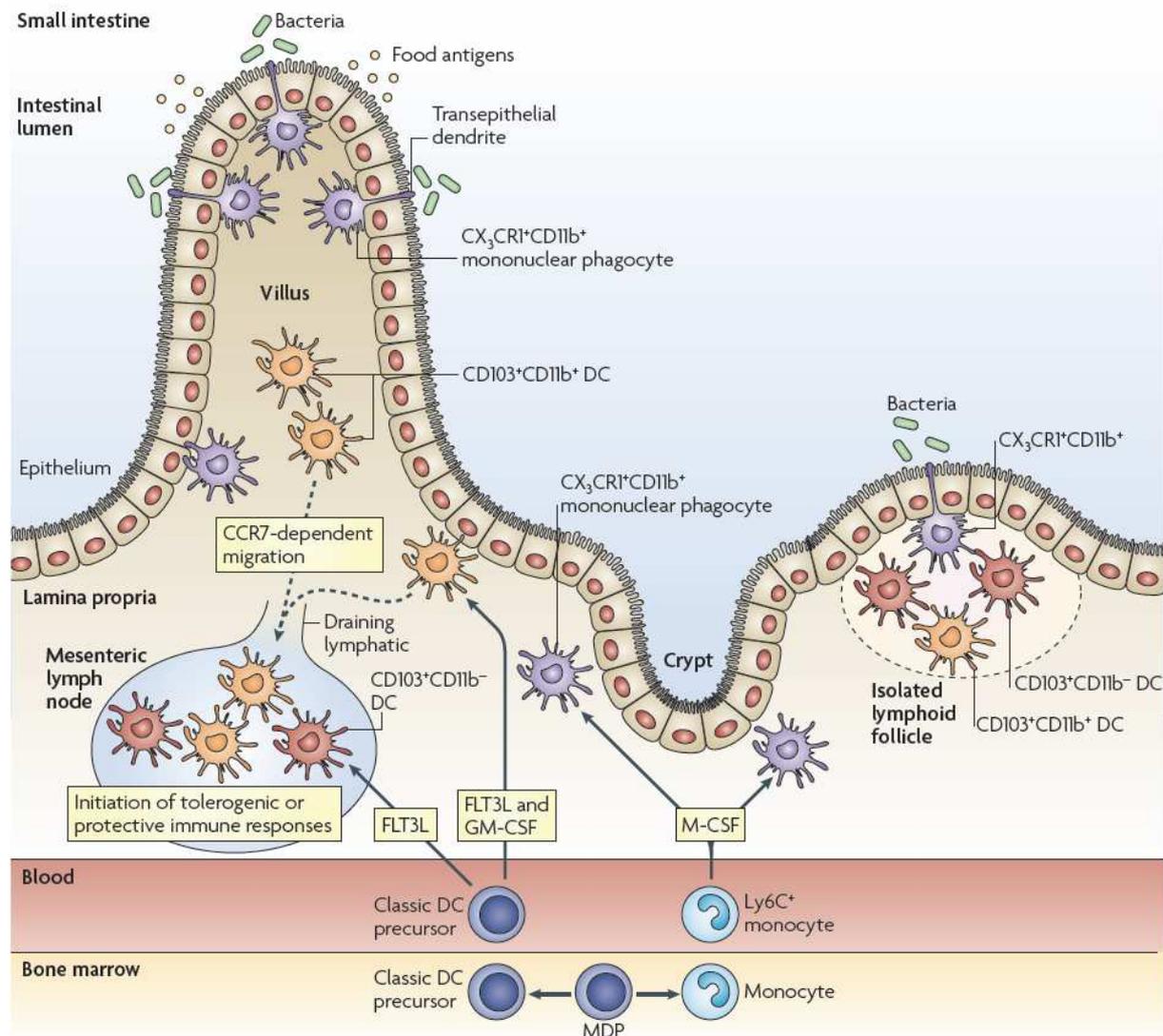
### a. Les DC des plaques de Peyer

Quatre sous-populations de DC ont été identifiées au sein des plaques de Peyer murines (Iwasaki and Kelsall, 1999, 2001; Johansson and Kelsall, 2005). Les DC CD11c<sup>high</sup> CD11b<sup>-</sup> CD8α<sup>+</sup>, situées dans les régions interfolliculaires riches en lymphocytes T, favorisent les réponses Th1 en produisant de grandes quantités d'IL-12p70. Au contraire, les DC CD11c<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup>, localisées au niveau du dôme sous-épithélial, stimulent les réponses Th2 en sécrétant abondamment de l'IL-10. La sous-population de DC CD11c<sup>high</sup> CD11b<sup>-</sup> CD8α<sup>-</sup>, retrouvée à la fois dans les régions interfolliculaires riches en lymphocytes T et au niveau du dôme sous-épithélial, induit des réponses de type Th1. Ces DC expriment également le récepteur à la fractalkine CX<sub>3</sub>CR1 et forment un réseau avec les cellules M du FAE (Salazar-Gonzalez et al., 2006). Enfin, on retrouve également les pDC CD11c<sup>intermediate</sup> CD11b<sup>-</sup> CD8α<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> qui, contrairement aux pDC des autres tissus, sont incapables de produire des IFN de type I sans doute à cause de la présence au sein de la muqueuse intestinale de facteurs régulateurs comme l'IL-10, le TGFβ et la prostaglandine E2 (Contractor et al., 2007).

### b. Les DC de la *lamina propria* intestinale

Des DC sont retrouvées profondément dans la *lamina propria* ou associées à l'épithélium. Ces dernières participent activement à la capture des antigènes de la lumière intestinale en étendant des prolongements cytoplasmiques entre les cellules épithéliales (Rescigno et al., 2001). Les deux principales sous populations de DC de la *lamina propria* expriment fortement le CD11c et sont différenciées par l'expression des marqueurs intégrine αEβ7 (CD103) et CX<sub>3</sub>CR1 (Bogunovic et al., 2009; Johansson-Lindbom et al., 2005; Varol et al., 2009). Deux études récentes ont montré que ces populations de DC sont issues de progéniteurs circulants distincts (Bogunovic et al., 2009; Varol et al., 2009). Les DC CD103<sup>+</sup> proviennent de la différenciation du précurseur commun aux DC et macrophages en pré-DC sous l'action du facteur de croissance Flt3L (FMS-like tyrosine kinase 3) (Varol et al., 2009). A l'état basal, les DC CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> expriment constitutivement et fortement le récepteur CCR7 (Bogunovic et al., 2009). Ces cellules sont donc capables de migrer jusqu'aux MLN où elles constituent la population majoritaire présentant les antigènes oraux aux lymphocytes T (Jaensson et al., 2008). Au contraire, les DC CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>, qui se différencient à partir de monocytes Ly6C<sup>high</sup> sous l'action du GM-CSF (granulocyte macrophage colony-

stimulating factor), ne migrent pas dans les ganglions drainants (Schulz et al., 2009) mais jouent un rôle dans la détection des antigènes luminaux (Niess et al., 2005; Rescigno et al., 2001). Une population de pDC  $CD11c^{intermédiaire}CMHII^{low}B220^{+}$  est également retrouvée au sein de la *lamina propria* (Chirido et al., 2005).



**Figure 5 : Origine, localisation et fonction des cellules dendritiques de la *lamina propria* intestinale.**

Dans la moelle osseuse, un précurseur commun DC et aux macrophages (MDP) se différencie en précurseur classique des DC ou en monocyte qui vont ensuite entrer dans la circulation sanguine pour rejoindre l'intestin. Localement, les précurseurs classiques des DC deviennent les DC  $CD103^{+}CD11b^{+/-}$  du GALT et donc de la *lamina propria*. Après reconnaissance de l'antigène, les DC  $CD103^{+}CD11b^{+}$  de la *lamina propria* migrent vers les MLN et induisent soit une tolérance antigène-spécifique soit une immunité protectrice. Les monocytes  $Ly6G^{+}$  se différencient localement en DC  $CX3CR1^{+}$  qui étendent leurs dendrites entre les cellules épithéliales. Bien que ces cellules ne puissent pas migrer vers les MLN, elles peuvent induire une réponse pro-inflammatoire locale. D'après Varol C et al, *Nature Reviews Immunology* 2010.

### c. Les DC des MLN

Les MLN hébergent un grand nombre de sous-populations de cDC caractérisées par les marqueurs CD8 $\alpha$ , CD11b et la protéine membranaire homologue au récepteur au mannose des macrophages DEC-205 (Anjuere et al., 2004; Henri et al., 2001; Iwasaki and Kelsall, 2001). Les MLN contiennent à la fois les DC migratrices de la *lamina propria* et les DC résidentes développées à partir de précurseurs de moelle osseuse. Ainsi, les DC CD11c<sup>high</sup> isolées des MLN exprimant le marqueur CD103 correspondent aux DC provenant de la muqueuse intestinale (Johansson-Lindbom et al., 2005; Schulz et al., 2009). En accord avec cette constatation, une diminution des DC CD103<sup>+</sup> est observée dans les MLN de souris CCR7<sup>-/-</sup>. De façon opposée, les DC CD103<sup>-</sup> des MLN proviennent de la différenciation de précurseurs arrivant de la circulation comme l'indique l'expression à leur surface du CD62L, un récepteur de domiciliation au niveau des MLN (Johansson-Lindbom et al., 2005).

Localisation	Phénotype	Caractéristiques
Plaques de Peyer	CD11c <sup>high</sup> CD11b <sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	Favorisent une réponse Th1 en produisant de l'IL-12
	CD11c <sup>high</sup> CD11b <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	Favorisent une réponse Th2 en produisant de l'IL-10
	CD11c <sup>high</sup> CD11b <sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	Favorisent une réponse Th1 en produisant de l'IL-12
	CD11c <sup>intermediate</sup> CD11b <sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	pDC produisant peu d'IFN de type I
<i>Lamina propria</i>	CD11c <sup>high</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup>	Expriment des dendrites trans-épithéliales
	CD11c <sup>low</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> CD70 <sup>+</sup>	Favorisent une réponse Th17
	CD11c <sup>high</sup> CD103 <sup>+</sup>	Favorisent la conversion de cellules T naïves en Treg
	CD11c <sup>intermediate</sup> CMHII <sup>low</sup> B220 <sup>+</sup>	pDC
Ganglions mésentériques	CD11c <sup>high</sup> CD11b <sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>intermediate</sup> CD103 <sup>+</sup>	DC provenant de la <i>lamina propria</i>
	CD11c <sup>high</sup> CD11b <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	Activent les cellules CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup>
	CD11c <sup>high</sup> CD11b <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	Faible inducteur des réponses CD4 <sup>+</sup>
	CD11c <sup>high</sup> CD11b <sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DEC205 <sup>+</sup>	Favorisent une réponse Th1 en produisant de l'IL-12
	CD11c <sup>intermediate</sup> B220 <sup>+</sup>	pDC produisant peu d'IFN de type I

**Tableau 3 : Distribution et caractéristiques des différentes sous-populations de cellules dendritiques intestinales.**

Selon leur localisation, les DC intestinales présentent un phénotype et des fonctions différentes.  
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde ; Treg : cellule T régulatrice

## 2. Capture et transport des antigènes par les DC intestinales

Les antigènes présents au niveau de la lumière intestinale sont pris en charge par les DC via plusieurs mécanismes :

- 1) Les antigènes solubles peuvent traverser l'épithélium par voie trans- ou para-cellulaire et être pris en charge par les DC de la *lamina propria* (Mowat, 2003).
- 2) Les cellules M des plaques de Peyer peuvent transporter, par endocytose et phagocytose, les antigènes luminaux de leur pôle apical à leur pôle baso-latéral (Neutra et al., 1996) et les présenter aux DC du dôme sous-épithélial.

3) Chez l'homme, le récepteur Fc néonatal (FcRn, neonatal Fc receptor), exprimé dans les tissus foëtaux, néonataux et adultes (Baker et al., 2009), transporte les immunoglobulines IgG au travers de l'épithélium pour les amener au niveau de la lumière intestinale où ils se lient à des antigènes. Le récepteur Fc néonatal recycle ensuite les complexes IgG-antigènes au travers de l'épithélium intestinal pour les délivrer aux DC de la *lamina propria* (Yoshida et al., 2004).

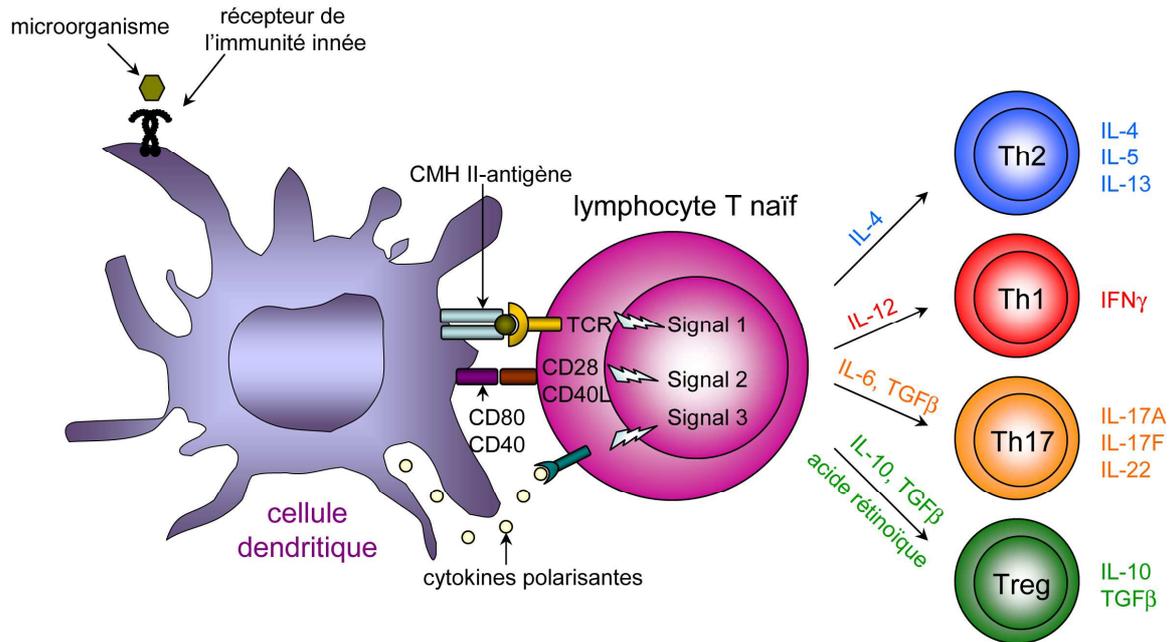
4) Certaines DC de la *lamina propria* sont capables d'étendre des prolongements cytoplasmiques entre les cellules épithéliales (Rescigno et al., 2001) pour détecter et capturer directement les antigènes présents dans la lumière intestinale. Ce mécanisme de projection de dendrites requiert une signalisation TLR dépendante de la voie MyD88 chez les cellules épithéliales et l'expression du marqueur CX<sub>3</sub>CR1 par les DC (Chieppa et al., 2006; Niess et al., 2005).

L'initiation des réponses cellulaires T muqueuses ne se produit probablement pas au sein de la *lamina propria* mais dans les organes lymphoïdes du GALT. Les antigènes captés au sein de la *lamina propria* sont présentés aux cellules T naïves dans les MLN uniquement par les DC CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>. En effet, contrairement aux DC CD103<sup>-</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>, cette sous population exprime le récepteur aux chimiokines CCR7 qui est nécessaire à la migration des DC vers les MLN (Bogunovic et al., 2009; Jang et al., 2006; Schulz et al., 2009).

### **3. Rôle des DC dans la mise en place de la réponse immune adaptative**

#### **a. Polarisation des lymphocytes T**

Après reconnaissance et capture des antigènes microbiens, les DC vont polariser la réponse lymphocytaire T adaptative grâce à 3 signaux : 1) la présentation de l'antigène par le CMH II au récepteur des cellules T (TCR, T cell receptor), 2) l'expression de molécules de co-stimulation comme CD80/CD86 et CD40 qui interagissent respectivement avec les molécules CD28 et CD40 ligand (CD40L) présentes sur les lymphocytes T et 3) la sécrétion de cytokines qui vont orienter la différenciation des cellules T naïves en lymphocytes T effecteurs (Th1, Th2, Th17) ou régulateurs (Treg) (Kapsenberg, 2003; Pulendran et al., 2008). Les lymphocytes Th1, qui produisent de l'IFN $\gamma$ , participent à l'immunité contre les pathogènes intracellulaires alors que les lymphocytes Th2 sont principalement impliqués dans l'activation des lymphocytes B en sécrétant des facteurs de croissance des cellules B comme l'IL-4. Les cellules Th17 jouent un rôle dans la défense de l'hôte contre un grand nombre de bactéries et de champignons (Dubin and Kolls, 2008) et exacerbent l'inflammation lors de pathologies auto-immunes (Steinman, 2008). En inhibant la fonction des cellules T effectrices, les Treg sont essentiels dans le contrôle des réponses inflammatoires et dans le maintien de la tolérance (Powrie et al., 2003).

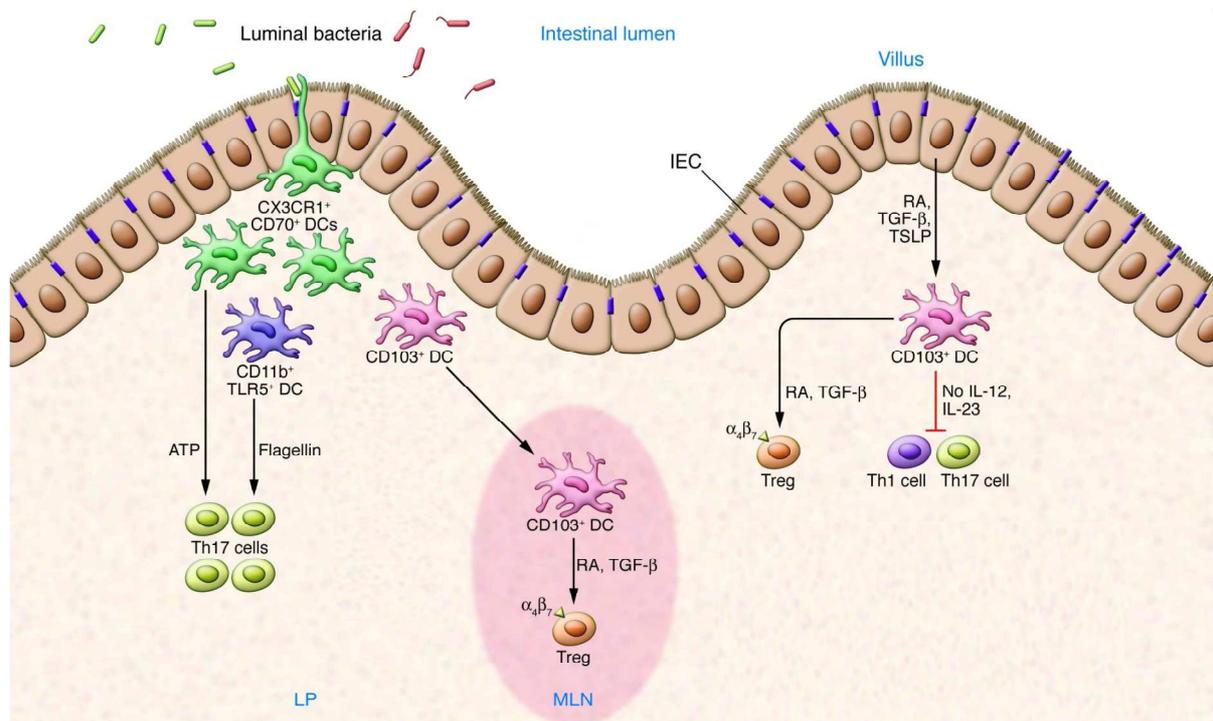


**Figure 6 : Polarisation des lymphocytes T par les cellules dendritiques.**

Après reconnaissance de motifs moléculaires microbiens par les PRR, les cellules dendritiques vont polariser les réponses T effectrices et régulatrices grâce à 3 signaux : 1) la présentation de l'antigène, 2) l'expression de molécules de co-stimulation et 3) la production de cytokines. Les sécrétions d'IL-10, d'IL-12p70, d'IL-6 et de TGF $\beta$ , d'IL-10, d'acide rétinoïque et de TGF $\beta$  induisent, respectivement, la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2, Th1, Th17 et Treg. Inspiré de *Kapsenberg ML, Nature Reviews Immunology 2003*.

En sécrétant de l'acide rétinoïque et du TGF $\beta$ , les DC CD103<sup>+</sup> de la *lamina propria* ou des MLN favorisent la conversion des cellules T naïves en cellules Treg FoxP3<sup>+</sup> (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007). Ces DC CD103<sup>+</sup> produisent également l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Matteoli et al., 2010). Cette enzyme présente des capacités immunosuppressives en carençant le milieu environnant en tryptophane, molécule nécessaire à la prolifération des lymphocytes T effecteurs, et en favorisant la génération *de novo* de cellules Treg (Fallarino et al., 2005; Sharma et al., 2007). Puisque l'acide rétinoïque et IDO inhibent le développement des cellules T produisant de l'IL-17 (Matteoli et al., 2010; Mucida et al., 2007), il semble peu probable que cette sous population puisse polariser à la fois les cellules Treg et les cellules Th17.

Au sein de la *lamina propria*, des DC caractérisées par une faible expression du CD11c et par l'expression des marqueurs CD70 et CX<sub>3</sub>CR1 favorisent le développement des cellules Th17. Ces DC CD11c<sup>low</sup>CD70<sup>+</sup> expriment également de nombreux récepteurs de l'ATP (adénosine triphosphate) et induisent, en présence d'ATP, la différenciation des cellules T naïves en cellules Th17 (Atarashi et al., 2008). Une autre population de cDC exprimant fortement le CD11b et le TLR5 favorise également la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules Th17 (Denning et al., 2007; Uematsu et al., 2008).



**Figure 7 : Distribution et fonction des cellules dendritiques de la lamina propria intestinale.**

Les DC  $CX_3CR1^+$  étendent des dendrites entre les cellules épithéliales. Après activation par de l'ATP ou de la flagelline, ces cellules, qui expriment également le marqueur CD70, vont favoriser la mise en place d'une réponse Th17. Les DC  $CD103^+$  migrent dans les ganglions drainants où elles induisent la différenciation de cellules T régulatrices en produisant de l'acide rétinoïque et du TGF $\beta$ . Le phénotype régulateur des DC  $CD103^+$  est conféré par le microenvironnement local, notamment par la production de TGF $\beta$ , d'acide rétinoïque et de TSLP par les cellules épithéliales. En plus de favoriser la différenciation de Treg ces DC  $CD103^+$  sont également capables d'inhiber le développement de réponses immunes Th1 ou Th17.

IEC : cellule épithéliale intestinale ; LP : lamina propria ; MLN : ganglion mésentérique ; RA : acide rétinoïque ; Treg : cellule T régulatrice ; TSLP : thymic stromal lymphopoietin.

D'après Rescigno M & Di Sabatino A, *The Journal of Clinical Investigation* 2009.

## b. Activation des lymphocytes B

La réponse humorale des muqueuses est caractérisée par la production d'immunoglobulines sécrétées de type IgA. L'activation et la différenciation des lymphocytes B naïfs en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines semblent dépendre de l'intégration de deux signaux : la reconnaissance de l'antigène par le récepteur des cellules B ou BCR (B cell receptor), qui entraîne une augmentation de l'expression des TLR par ces cellules, et l'interaction des lymphocytes B 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 ensuite avec les lymphocytes B (Garside et al., 1998). Cette activation des cellules B par les lymphocytes T met en jeu une interaction entre la molécule de co-stimulation CD40 présente sur les lymphocytes B et le CD40L des lymphocytes T activés ainsi que la production de TGF $\beta$  par les cellules stromales (DeFrance et al., 1992). Les IgA, et en particulier les IgA sécrétées, sont majoritaires au niveau des

muqueuses. Par la production d'iNOS (inducible nitric oxide synthase) et de  $TNF\alpha$ , les DC du GALT favorisent leur commutation isotypique en augmentant l'expression du récepteur au  $TGF\beta$  des lymphocytes B (Tezuka et al., 2007). Toutefois, après reconnaissance de l'antigène, les DC peuvent également influencer la fonction des lymphocytes B par des mécanismes indépendants des lymphocytes T. La reconnaissance d'antigènes luminaux par les DC du GALT provoque un changement du profil de leur expression génique. Les DC vont alors produire les facteurs APRIL (a proliferation and inducing ligand) et BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family) qui promeuvent directement la production d'IgA par les plasmocytes (Massacand et al., 2008). BAFF et APRIL, qui présentent un fort degré d'homologie, sont impliqués non seulement dans la maturation des lymphocytes B mais aussi dans leur survie. La plasticité de l'expression des récepteurs pour ces 2 molécules par les lymphocytes B aux différents stades de leur maturation confère des rôles alternatifs à ces deux ligands (Bossen and Schneider, 2006). La production d'APRIL par les DC est augmentée, après la reconnaissance de l'antigène par les TLR, par un mécanisme dépendant de l'iNOS (Massacand et al., 2008; Tezuka et al., 2007). Au sein des plaques de Peyer, la sous population de DC  $CD11b^+$  produit de l'IL-10, du  $TGF\beta$ , de l'IL-6 et de l'acide rétinoïque, molécules requises pour la commutation isotypique en IgA (Iwasaki and Kelsall, 2001; Mora et al., 2006; Sato et al., 2003).

## **Chapitre 2 : Interactions hôte-bactérie au niveau intestinal : de l'homéostasie à l'inflammation chronique**

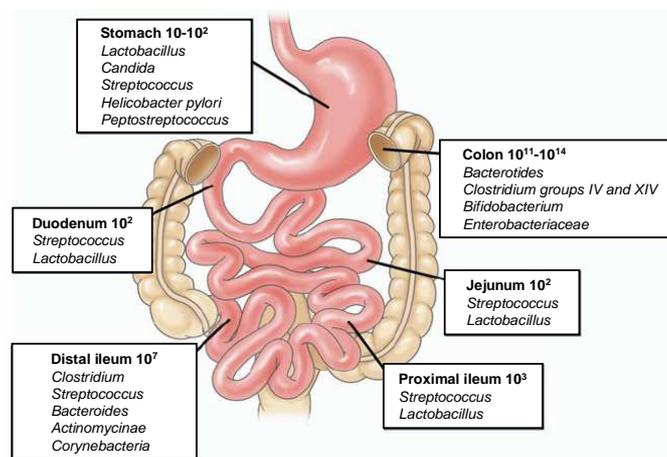
### **I. Microbiote et régulation de l'homéostasie intestinale**

L'intestin humain abrite une communauté de micro-organismes dense et diverse dont le nombre est estimé entre 10 et 100 trillions d'individus (Xu and Gordon, 2003). Ce microbiote est majoritairement représenté par des bactéries bien que l'on retrouve également des eucaryotes, des virus et des archées (Eckburg et al., 2005). La communauté bactérienne intestinale d'un individu est composée de plus de 1000 espèces différentes et constitue un écosystème microbien diversifié et dynamique. Ces populations bactériennes résidentes ont de nombreux effets bénéfiques pour l'hôte notamment en contribuant au métabolisme des polysaccharides alimentaires (Martens et al., 2008; Sonnenburg et al., 2005), au développement du système immunitaire, au maintien de l'homéostasie et au contrôle de la colonisation de la muqueuse par des micro-organismes pathogènes. En retour, le microbiote intestinal tire profit de cette association en bénéficiant d'un habitat protégé et d'un environnement riche en nutriments. Cette interaction mutuellement bénéfique entre l'hôte et le microbiote constitue une symbiose.

#### **A. Composition du microbiote intestinal**

L'établissement du microbiote débute immédiatement après la naissance et est influencée par l'alimentation infantile, le niveau d'hygiène et la prise de médicaments (Gronlund et al., 1999). Chez l'adulte, la charge microbienne intestinale, estimée à  $10^{13}$ - $10^{14}$  micro-organismes, soit 10 fois plus que le nombre de cellules totales du corps humain, contient collectivement 100 fois plus de gènes que le génome humain (Gill et al., 2006). Les genres bactériens dominants retrouvés chez l'adulte sont *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium*. Cependant, la plupart des espèces bactériennes n'est ni cultivable ni identifiable avec les techniques fondées sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques. Plus récemment, les méthodes moléculaires, telles que le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S, ont permis de réaliser une meilleure caractérisation des communautés bactériennes intestinales et une classification phylogénétique des espèces. 99% du microbiote intestinal se répartit entre 4 groupes bactériens ou *phyla* : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Proteobacteria et les Actinobacteria. Les *phyla* les plus représentés sont des bactéries à Gram positif anaérobies Firmicutes (64% des espèces du côlon) et Bacteroidetes (23% des espèces). Les entérobactéries comme *Escherichia coli* sont un composant minoritaire (8% des espèces) de la division des Proteobacteria (Eckburg et al., 2005; Frank et al., 2007; Hayashi et al., 2002; Hold et al., 2002). La répartition du microbiote n'est pas homogène le long du tractus

intestinal puisque la densité et la complexité bactérienne augmentent progressivement de sa partie proximale vers sa partie distale. Ainsi, on observe  $10^2$ - $10^7$  CFU (colony forming unit)/g de contenu dans l'estomac et le duodénum,  $10^2$ - $10^7$  CFU/g dans le jéjunum et l'iléon et  $10^{11}$ - $10^{14}$  CFU/g dans le côlon (O'Hara and Shanahan, 2006).



**Figure 8 : Distribution et densité des espèces microbiennes dominantes dans les différentes parties du tractus intestinal.**

D'après Sartor RB, *Gastroenterology* 2008.

## B. Rôle du microbiote dans la mise en place du système immunitaire

Chez l'enfant, la mise en place séquentielle du microbiote joue un rôle important dans le développement et la maturation du système immunitaire ainsi que sur l'équilibre des populations lymphocytaires Th1, Th2 et Treg (Adlerberth and Wold, 2009; Gaboriau-Routhiau et al., 2003; Round et al., 2010). Un retard dans la colonisation du tube digestif du nouveau-né pourrait aboutir à un défaut de maturation du système immunitaire et favoriserait l'incidence des maladies allergiques et auto-immunes.

La reconnaissance du microbiote par le système immunitaire inné est indispensable à la mise en place et au bon fonctionnement des systèmes immunitaires muqueux et périphériques (Macpherson and Harris, 2004). En effet, les souris sans microbiote ou axéniques présentent des centres germinatifs des plaques de Peyer peu nombreux et de petite taille (Shroff and Cebra, 1995) ainsi qu'une diminution du nombre des plasmocytes producteurs d'IgA (Benveniste et al., 1971), des cellules CD8<sup>+</sup> présentant un TCR  $\alpha\beta$  et des lymphocytes CD4<sup>+</sup> producteurs d'IL-17, d'IFN $\gamma$ , de TNF $\alpha$  et d'IL-10 au sein de la *lamina propria* intestinale (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Guy-Grand et al., 1991; Macpherson and Uhr, 2004; Niess et al., 2008). Les souris axéniques présentent également une diminution des lymphocytes Treg producteurs d'IL-10 et de TGF $\beta$  dans les MLN et les plaques de Peyer (Ishikawa et al., 2008). En périphérie, le développement des zones folliculaires T et B de la rate et des ganglions lymphatiques est également altéré chez ces souris (Smith et al., 2007).

L'introduction, chez les souris axéniques, d'un polysaccharide purifié de la bactérie commensale *Bacteroides fragilis*, une des espèces bactérienne dominante chez la souris naïve, permet de rétablir les compartiments lymphoïdes périphériques en activant le TLR2 (Mazmanian et al., 2005), démontrant que les signaux des bactéries commensales sont essentiels pour le développement du système immunitaire. Les bactéries commensales favorisent également le développement de sous populations lymphocytaires clé. Elles permettent, en effet, la commutation isotypique des cellules B humaines (He et al., 2007), le développement de cellules Th17 effectrices (Ivanov et al., 2008) et limitent la production de Treg au niveau intestinal (Hall et al., 2008). La formation des tissus lymphoïdes intestinaux, tels que les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés, s'effectue à partir des cellules « lymphoid tissue inducer » (LTi). La reconnaissance du peptidoglycane des bactéries à Gram négatif du microbiote intestinal par NOD1 est nécessaire et suffisante pour la formation de ces tissus lymphoïdes (Boukora et al., 2008). Bien que le microbiote participe au maintien de l'homéostasie intestinale, le rôle de chaque espèce bactérienne reste encore à déterminer. Par l'utilisation de souris gnotobiotiques (animaux dont la composition du microbiote est connu), il a été mis en évidence qu'un nombre restreint d'espèces commensales, dont les bactéries filamenteuses segmentées (Filamentous Segmented Bacteria), participe à la maturation du système immunitaire intestinal (Gaboriau-Routhiau et al., 2009).

### **C. Modulation du système immunitaire muqueux par le microbiote intestinal**

Le système immunitaire muqueux doit coexister avec un nombre important de micro-organismes sans induire de réponses immunes locales ou systémiques préjudiciables pour l'hôte. La prévention de ces réponses immunitaires peut s'effectuer par une séparation physique des bactéries et des cellules de l'hôte (sécrétion de mucus, production d'IgA) et par le maintien de la tolérance immunitaire.

Le microbiote induit un environnement immuno-modulateur au niveau intestinal. Les souris axéniques présentent une diminution de l'expression de la cytokine immunorégulatrice IL-25 au niveau du côlon (Zaph et al., 2008). Cette diminution de la production d'IL-25 est corrélée à une augmentation de l'expression de la cytokine IL-23 et à une fréquence plus importante des cellules pro-inflammatoires Th17 dans la *lamina propria* du côlon. Paradoxalement, la fréquence des cellules Th17 présentant un TCR  $\beta^+$  est diminuée au niveau de l'intestin grêle (Atarashi et al., 2008; Niess et al., 2008). Il apparaît donc que le microbiote intestinal influence différemment les cellules immunes selon l'endroit du tractus intestinal. Cette compartimentation de l'influence du microbiote résulte des différences de composition du microbiote le long de l'intestin. Les signaux induits par les agonistes des TLR4 et TLR2, le LPS et les LTA, présents respectivement sur les bactéries Gram négatif et

Gram positif du microbiote, influencent l'homéostasie intestinale (Medzhitov, 2007). En effet, des 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 (dextran sodium sulfate). Le traitement de ces souris avec du LPS ou des LTA limite l'inflammation intestinale et protège du développement de la colite chimique (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

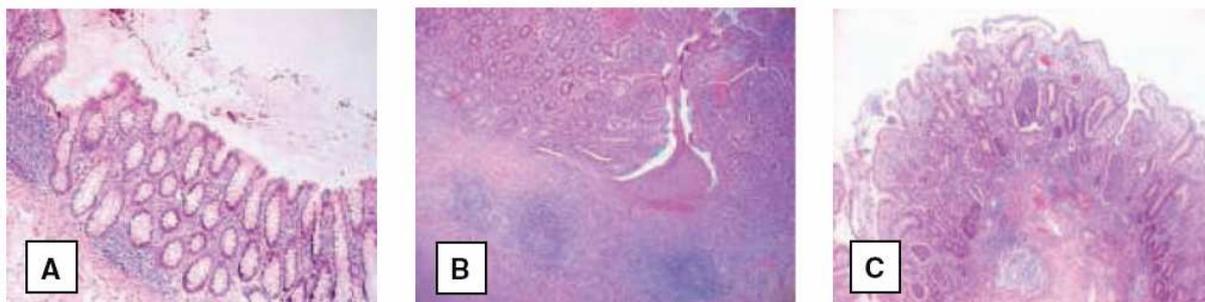
Les cellules épithéliales sont essentielles pour le maintien de l'homéostasie intestinale en formant une barrière entre la lumière intestinale et les cellules immunitaires de l'hôte. Les bactéries commensales limitent les signaux pro-inflammatoires des cellules épithéliales intestinales en modulant le système ubiquitine-protéasome et l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B (Kelly et al., 2004; Kelly et al., 2005; Kumar et al., 2007). Par exemple *Bacteroides thetaiotaomicron* empêche l'activation de NF- $\kappa$ B en favorisant le transport de sa sous-unité RelA hors du noyau via un mécanisme dépendant de PPAR $\gamma$  (peroxysome proliferator-activated receptor gamma) (Kelly et al., 2004). Le butyrate produit par les bactéries commensales est une source d'énergie pour les cellules épithéliales du côlon et réduit l'expression du TNF $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 par les lymphocytes de la *lamina propria* via une inhibition de la voie NF- $\kappa$ B (Luhrs et al., 2002; Segain et al., 2000). La compartimentation des TLR permet également de maintenir l'homéostasie intestinale. La localisation du TLR5 au pôle basolatéral des cellules épithéliales permet uniquement la détection de bactéries flagellées invasives et participe au contrôle du nombre de bactéries dans la lumière intestinale en favorisant notamment la production de peptides antimicrobiens (Vijay-Kumar et al., 2008). La stimulation du TLR9 situé au pôle apical des cellules épithéliales, contrairement à sa stimulation au pôle basolatéral, inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B induite par l'activation d'autres TLR (Lee et al., 2006). En plus de la régulation négative de voies de signalisation pro-inflammatoires, la présence permanente de composants bactériens spécifiques empêche les réponses immunes en induisant un état de non réponse des cellules épithéliales en diminuant l'expression des TLR2 et TLR4 (Otte et al., 2004). Les cellules épithéliales peuvent induire la tolérance en favorisant la production de grandes quantités d'IL-10 et peu d'IL-12 par les DC, limitant ainsi les réponses Th1 et favorisant une réponse immune régulatrice (Rimoldi et al., 2005). L'état tolérogène des DC peut être conditionné par la sécrétion de TSLP (thymic stromal lymphoprotein) et de TGF $\beta$  par des cellules épithéliales intestinales stimulées par des bactéries commensales. Les bactéries à Gram positif de la famille des lactobacilles sont d'ailleurs plus efficaces que la bactérie à Gram négatif *E. coli* pour promouvoir cet état tolérogène (Zeuthen et al., 2008a). L'activation des cellules épithéliales intestinales ainsi que l'induction de signaux pro-inflammatoires et la maturation des DC au travers de la barrière épithéliale semblent

dépendre de composants spécifiques des bactéries commensales. En effet, les bactéries à Gram négatif ainsi que leur constituant de paroi, le LPS, induisent une forte production de chimiokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales et la maturation des DC (Zoumpopoulou et al., 2009). Enfin, le phénotype des cellules immunitaires intestinales diffère de celui des cellules immunes correspondantes retrouvées en périphérie. Par exemple, les DC de la muqueuse intestinale induisent préférentiellement une réponse Th2 (Iwasaki and Kelsall, 1999) et des cellules Treg (Kelsall and Leon, 2005), favorisant ainsi un environnement anti-inflammatoire.

## II. Influence du microbiote dans le développement des maladies inflammatoires chroniques intestinales

Le système immunitaire intestinal a pour rôle d'induire une réponse immune envers des pathogènes tout en restant relativement peu sensible aux antigènes alimentaires et du microbiote.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, représentées principalement par la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont des maladies multifactorielles caractérisées par des poussées inflammatoires entrecoupées de phases de rémission. Les patients atteints de maladie de Crohn présentent des lésions transmurales touchant entièrement le tractus digestif, depuis la bouche jusqu'à l'anus, et des réponses cytokiniques muqueuses Th1 (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-12) et Th17 (IL-17A, IL-21, IL-23) exacerbées. La rectocolite hémorragique se définit par des lésions superficielles de la muqueuse et de la sous muqueuse du côlon et par une production excessive de cytokines Th2 (IL-5, IL-13) (Shih and Targan, 2008; Strober et al., 2007).

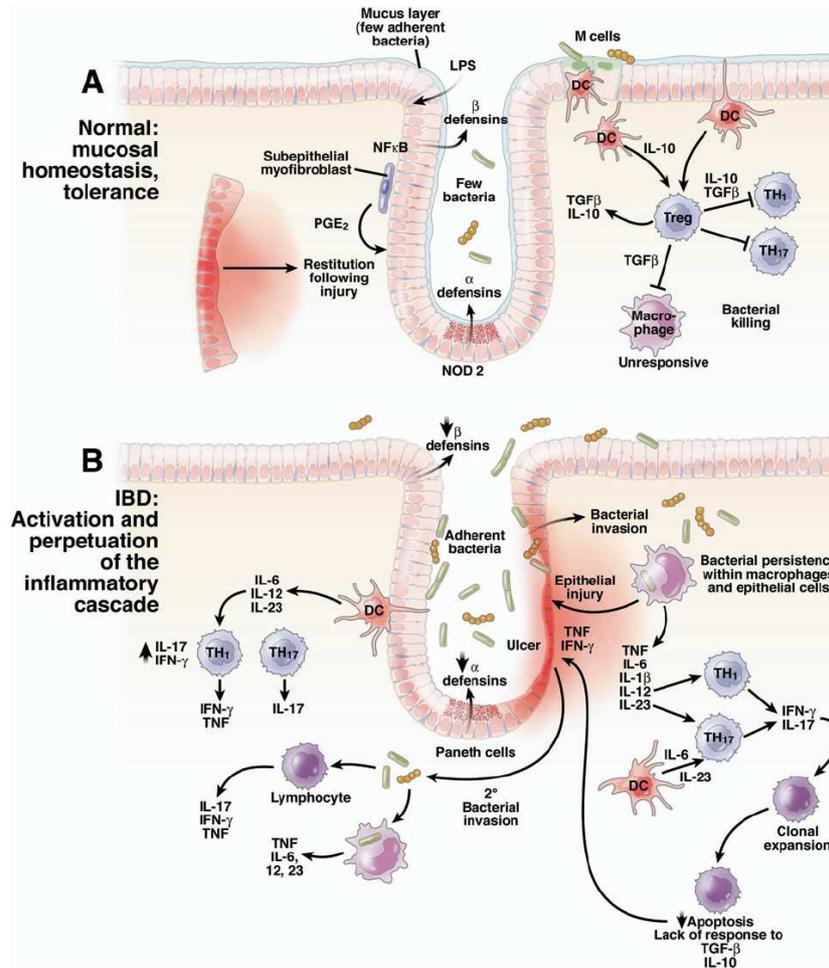


**Figure 9 : Coupes histologiques de côlons provenant d'un individu sain ou de patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique.**

**A.** Le côlon normal possède des glandes remplies de cellules de Goblet sécrétant du mucus. **B.** Le côlon d'un patient atteint de maladie de Crohn présente un épaissement de la muqueuse, un infiltrat massif de cellules lymphoïdes et un ulcère de la sous-muqueuse vers la lumière de la muqueuse. **C.** Lors de la rectocolite hémorragique, la muqueuse est également épaissie et infiltrée par des cellules inflammatoires. De nombreux neutrophiles sont présents dans les abcès au niveau des cryptes.

D'après MacDonald TT & Monteleone G, *Science* 2005.

Bien que l'étiologie exacte des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin reste encore inconnue à ce jour, il est de plus en plus reconnu que ces pathologies résultent d'une réponse immune anormale vis-à-vis du microbiote chez des individus génétiquement prédisposés. Cette rupture de la tolérance du système immunitaire envers le microbiote aboutirait à la transformation de l'inflammation « physiologique » de la muqueuse retrouvée en condition normale en une réponse inadaptée conduisant à des lésions intestinales (Sartor, 2008).



**Figure 10 : Comparaison des interactions hôte/bactéries en condition normale (homéostasie) et inflammatoire (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin).**

**A.** En situation normale, la densité microbienne et la capture des antigènes sont limitées et contrôlées. L'épithélium intestinal est dans un état de « non réponse » grâce à l'induction de cellules de l'immunité innée et adaptative régulatrices (cellules dendritiques tolérogènes, Treg) et à la production de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGFβ) et de peptides anti-microbiens (α-défensines)

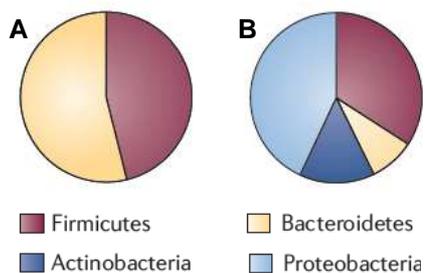
**B.** Lors de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (IBD, inflammatory bowel diseases), l'absence de sécrétion continue de peptides anti-microbiens favoriserait l'attachement et l'invasion des bactéries au sein de l'épithélium intestinal. La persistance bactérienne au sein de l'épithélium et des cellules phagocytaires de la muqueuse intestinale provoquerait alors la stimulation des réponses Th1 et Th17 et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-23, IL-1β, IL-6 et TNFα) ce qui conduirait à une inflammation chronique et à des lésions tissulaires perpétuées par la translocation des bactéries et des antigènes microbiens.

D'après Sartor RB, *Gastroenterology* 2008.

Le rôle prépondérant du microbiote dans l'induction et la persistance des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin est conforté, d'une part, par l'amélioration des symptômes après traitement des patients avec des antibiotiques (Feller et al., 2010; Prantera et al., 2002) et, d'autre part, par la présence de lésions inflammatoires plus prononcées dans les régions de l'intestin abritant les plus fortes densités de bactéries comme le côlon. De nombreux modèles animaux ont également mis en évidence le rôle du microbiote dans le développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Les souris déficientes pour l'IL-10 (souris IL-10<sup>-/-</sup>) et pour l'IL-2 (souris IL-2<sup>-/-</sup>) élevées dans des conditions classiques développent spontanément une colite chronique alors qu'elles ne présentent pas d'inflammation intestinale dans des conditions stériles (Sellon et al., 1998). Une colite peut également être induite chez des souris saines par le transfert adoptif de cellules T CD4<sup>+</sup> réactives contre des espèces du microbiote (Kullberg et al., 2003; Sartor, 1997).

### **A. Changement de la composition du microbiote chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

La composition du microbiote intestinal varie entre les individus en fonction de leur situation géographique, de leurs habitudes alimentaires et de leur état de santé. Des modifications de la composition du microbiote intestinal, appelées dysbioses, ont été observées chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Figure 11). Des comparaisons phylogénétiques ont mis en évidence des différences de composition entre le microbiote intestinal de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et d'individus sains (Kassinen et al., 2007; Marteau, 2009). Une diminution de la biodiversité des Firmicutes (*Lachnospiraceae* et *Bacterotides*), un enrichissement en Protéobactéries et une disparition de certaines espèces comme *Faecalibacterium prausnitzii* ont notamment été observés chez les patients atteints de maladies de Crohn ou de rectocolite hémorragique (Sokol et al., 2009). D'autres études ont également rapporté que ces patients présentent une augmentation des entérobactéries, une diminution des bifidobactéries et la présence de bactéries dominantes inhabituelles (Seksik et al., 2003; Sokol et al., 2006). Des micro-organismes potentiellement pro-inflammatoires ont également été retrouvés plus fréquemment chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Ainsi, une forte densité de *E. coli* entéroadhérentes et entéroinvasives a été retrouvée durant les phases actives de la maladie de Crohn (Darfeuille-Michaud et al., 1998).



**Figure 11 : Changement de la composition du microbiote chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.** Répartition des *phyla* bactériens retrouvés dans les prélèvements caecaux d'individus sains (A) ou de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (B). D'après Spor A et al, *Nature Reviews Microbiology* 2011.

## **B. Dérégulation de l'expression des récepteurs de l'immunité innée et développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

Dans un modèle d'inflammation chronique intestinale murine, une déficience dans la signalisation des TLR prévient le développement de l'inflammation intestinale, démontrant que l'activation des TLR par le microbiote est essentielle pour la pathogénèse de la maladie (Nenci et al., 2007). Chez l'homme, l'augmentation de l'expression des TLR au sein de la muqueuse des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin pourrait conduire à une augmentation de la sensibilité de l'hôte vis-à-vis des bactéries du microbiote intestinal. Comparativement à des sujets contrôle, une accumulation de cellules épithéliales exprimant le TLR2 est retrouvée au niveau de la muqueuse iléale de patients atteints de rectocolite hémorragique. La proportion de cellules exprimant le TLR4 est également augmentée dans l'iléon terminal de patients présentant une maladie de Crohn active et dans l'iléon terminal et le rectum de patients atteints de rectocolite hémorragique en rémission. Des macrophages inflammatoires CD68<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> sont également présents en plus grand nombre dans la *lamina propria* de l'iléon terminal de patients avec une maladie de Crohn active ou inactive et dans la *lamina propria* du caecum de patients avec une rectocolite hémorragique active ou en rémission (Frolova et al., 2008).

## **C. Lien entre un défaut du contrôle du microbiote par le système immunitaire et le développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

Chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin la fonction barrière de l'épithélium est profondément altérée du fait de la présence d'une couche de mucus plus fine et irrégulière exposant l'épithélium directement au microbiote intestinal (Swidsinski et al., 2007). L'augmentation du nombre de bactéries en contact avec la muqueuse intestinale peut également résulter d'une incapacité du système immunitaire à contrôler le microbiote intestinal. En effet, un défaut de production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales se retrouve à la fois chez les patients

atteints de maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique (Aldhous et al., 2009; Mukherjee et al., 2008; Nuding et al., 2007; Wehkamp et al., 2004).

30 à 50 % des patients atteints de maladie de Crohn présentent au moins une variation génétique sur le gène *Nod2*. Trois polymorphismes majeurs de ce gène sont associés à la maladie de Crohn (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001a) : Gly908Arg, Arg702Trp et une mutation résultant d'une insertion dans le cadre de lecture de la Leu1007 (mutation Leu1007fsinsC). Ces mutations, localisées au sein ou à proximité du domaine de reconnaissance des ligands, confèrent au patient un phénotype « perte de fonction » en empêchant l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par le MDP et de ce fait l'élimination des bactéries (Inohara et al., 2003). Ainsi, la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF $\alpha$ ) par les cellules mononucléées isolées de sang périphérique après stimulation par du MDP est altérée chez les patients de Crohn possédant la mutation Leu1007fsinsC (Netea et al., 2004; van Heel et al., 2005). Ces observations sont pourtant en contradiction avec l'augmentation de l'inflammation dépendante de NF- $\kappa$ B observée dans les prélèvements cliniques de patients atteints de maladie de Crohn. Plusieurs hypothèses établissent un lien entre ces mutations « perte de fonction » et le développement de la maladie :

– La première hypothèse suggère que la perte de fonction de NOD2 dans les cellules épithéliales intestinales et les cellules phagocytaires conduit à une déficience dans la fonction barrière de l'épithélium et donc à une augmentation de l'invasion microbienne et de l'inflammation. En effet, de nombreux processus régulés par NOD2 peuvent contribuer au maintien de la fonction barrière de l'épithélium. Premièrement la diminution de la production de peptides antimicrobiens comme les défensines chez les patients de Crohn favorise une dérégulation de la croissance du microbiote intestinal et une augmentation de la sensibilité aux infections par les bactéries entériques. Ceci est corroboré par deux observations : premièrement, les patients de Crohn ayant une mutation de *Nod2* présentent une réduction de l'expression des  $\alpha$ -défensines dans la muqueuse iléale (Wehkamp et al., 2004) et deuxièmement les souris *Nod2*<sup>-/-</sup> sont plus sensibles aux infections orales par *Listeria monocytogenes* et présentent une diminution de la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth (Kobayashi et al., 2005). L'autophagie et la production d'espèces réactives de l'oxygène, des processus impliqués dans l'élimination des pathogènes, sont également diminuées chez les cellules épithéliales et les DC de patients de Crohn avec une mutation *Nod2* (Cooney et al., 2010; Lipinski et al., 2009; Travassos et al., 2010).

– La deuxième hypothèse propose que NOD2 soit un régulateur négatif du TLR2 et que sa perte de fonction provoque une exacerbation de la réponse pro-inflammatoire initiée par le TLR2 au sein des DC et des macrophages intestinaux (Watanabe et al., 2004).

– Une troisième hypothèse, provenant des études réalisées avec des souris exprimant la mutation *Leu1007fsinsC*, suggère que cette mutation est une mutation « gain de fonction » (Maeda et al., 2005). Les macrophages de ces souris stimulés avec du MDP présentent une activation exacerbée de NF- $\kappa$ B ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-1 $\beta$ . Cependant, ces résultats sont en opposition avec ceux montrant que les patients de Crohn homozygotes pour cette mutation présentent un phénotype « perte de fonction » (Inohara et al., 2003; van Heel et al., 2005).

– Récemment, il a été montré qu'une mutation de *Nod2* associée à la maladie de Crohn diminuait la production de la cytokine immuno-régulatrice IL-10 (Noguchi et al., 2009).

Des polymorphismes du TLR4 ont également été retrouvés dans des cohortes de patients souffrant de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique (Brand et al., 2005; Torok et al., 2004). Des souris déficientes pour les récepteurs TLR2, TLR4, TLR5 et pour l'adaptateur MyD88 sont plus susceptibles que les souris naïves aux colites spontanées ou induites (Araki et al., 2005; Fukata et al., 2005; Gibson et al., 2008a; Gibson et al., 2008b; Rakoff-Nahoum et al., 2004; Vijay-Kumar et al., 2007). Un défaut dans la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B au sein des cellules épithéliales intestinales favorise également l'inflammation intestinale spontanée ou induite chimiquement par du DSS (Nenci et al., 2007; Steinbrecher et al., 2008). Les souris déficientes pour le facteur de transcription T-bet, impliqué dans la différenciation des cellules T naïves en cellules Th1 et dans la production de TNF, présentent, comme chez les patients atteints de rectocolite hémorragique, une dérégulation du microbiote avec une prédominance de bactéries colitogènes favorisant l'inflammation intestinale (Garrett et al., 2007). De plus, une polarisation Th1 mise en place par l'IL-27, indépendamment de la sous-unité p40 de l'IL-12/IL-23 et des TLR, est responsable de l'apparition d'une inflammation intestinale spontanée semblable à celle observée lors de rectocolites hémorragiques chez les souris IL-2<sup>-/-</sup> (Rakoff-Nahoum et al., 2006).

Chez des patients atteints de maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique, des polymorphismes nucléotidiques ont été observés dans des gènes codant pour les protéines impliquées dans le processus d'autophagie ATG16L1 (autophagy-related 16-like protein 1) et IRGM (immunity-related GTPase family M) (Hampe et al., 2007; Prescott et al., 2007; Rioux et al., 2007). Ces polymorphismes pourraient être associés à une altération de la dégradation intracellulaire de bactéries puisque l'autophagie est un mécanisme impliqué dans l'élimination des pathogènes intracellulaires (Biswas et al., 2008; Zhao et al., 2008). De façon intéressante, NOD2 participe à l'autophagie des bactéries invasives en recrutant la protéine ATG16L1 au site d'entrée de la bactérie (Travassos et al., 2010). Ce lien mécanistique entre deux gènes de susceptibilité à la maladie de Crohn suggère qu'une dérégulation de l'axe NOD2/ATG16L1 peut favoriser l'apparition la maladie.

## **D. Perte de la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

Les polymorphismes retrouvés chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin peuvent également être impliqués dans la perte de la réponse immune non inflammatoire envers le microbiote intestinal. Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation du récepteur NOD2 par la flore commensale participe à la régulation négative des TLR en réponse à l'environnement muqueux (Watanabe et al., 2006). L'agoniste de NOD2, le MDP, protège les souris de colites induites chimiquement (TNBS et DSS) et diminue l'habileté des cellules du côlon et des MLN à répondre aux agonistes des TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 et TLR9 (Watanabe et al., 2008). Ce phénomène de « tolérance croisée » entre NOD2 et les TLR2 et TLR4 est perdu chez les patients atteints de maladie de Crohn homozygotes pour la mutation Leu1007insC (Hedl et al., 2007).

Les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin présentent également un dérèglement dans la circulation et la répartition des cellules immunes. En effet, une augmentation de la production de chimiokines pro-inflammatoires (CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL8), molécules recrutant les leucocytes, est retrouvée dans le côlon des patients atteints de maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique (Banks et al., 2003). L'influx au sein de la muqueuse intestinale de DC provenant directement du sang périphérique contribue à l'amplification de la maladie et aux rechutes puisque ces cellules échappent au conditionnement « tolérogène » des cellules épithéliales intestinales. Au cours des poussées de la maladie, les patients présentent une diminution du pourcentage de DC myéloïdes et plasmacytoïdes sanguines comparativement à des individus sains ou en rémission. Ces DC possèdent presque toutes le marqueur de domiciliation intestinal  $\alpha 4\beta 7$ , suggérant un recrutement massif des DC du sang périphérique au niveau de l'intestin pendant les phases aiguës de la pathologie (Baumgart et al., 2005).

Un dérèglement de la réponse cytokinique muqueuse est aussi une caractéristique des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Les signaux du microbiote intestinal conduisent à la production, par les DC iléales, d'IL-23, une cytokine constituée de deux sous-unités (p19 et p40) et impliquée dans la différenciation des cellules Th17. Les productions d'IL-23 et d'IL-17 sont augmentées chez les patients atteints de maladie de Crohn (Holtta et al., 2008). Une mutation de la sous unité p19 de l'IL-23 empêche l'apparition de colite spontanée chez des souris IL-10<sup>-/-</sup> alors que l'administration d'IL-23 chez des souris immunodéficientes RAG reconstituées par les cellules T CD4<sup>+</sup> provenant de souris IL-10<sup>-/-</sup> exacerbe la colite (Yen et al., 2006). Les polymorphismes du récepteur à l'IL-23, tout comme ceux de la sous-unité p40 commune à l'IL-12 et l'IL-23, sont également associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Barrett et al., 2008; Duerr et al., 2006;

Fisher et al., 2008). Une augmentation du nombre de transcrits de l'IL-17 est retrouvée dans les régions enflammées de la muqueuse de patients atteints de maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique (Fujino et al., 2003; Kobayashi et al., 2008). Une augmentation du nombre d'une sous population de lymphocytes T non conventionnels, les cellules NKT (natural killer T), est retrouvée au sein des cellules mononucléées de la *lamina propria* de patients atteints de rectocolite hémorragique. Ces cellules produisent en grande quantité de l'IL-5 et de l'IL-13 (Fuss et al., 2004).

## Chapitre 3 : Les probiotiques

### I. Généralités

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Elie Metchnikoff a remarqué que la longévité et la bonne santé des paysans bulgares étaient liées à leur consommation de laits fermentés et a suggéré que certains micro-organismes pourraient exercer des effets bénéfiques sur la santé humaine. Provenant de l'expression grecque « pro bios » qui signifie littéralement « pour la vie », le terme probiotique a été proposé pour la première fois par Lilly et Stilwell en 1965 pour définir des substances produites par un micro-organisme stimulant la croissance d'autres micro-organismes. En 1974, Parker définit les probiotiques comme des micro-organismes et substances qui contribuent au maintien de l'équilibre du microbiote intestinal. Depuis, la définition a évolué et un panel d'experts désigné par la « Food and Agricultural Organization » (FAO) et la « World Health Organization » (WHO) désigne actuellement comme probiotique « tout micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité adéquate, exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte ».

#### A. Caractéristiques et nature des probiotiques

Pour être considéré comme probiotique, un micro-organisme doit présenter une innocuité pour l'hôte, être résistant aux acides gastriques et aux sels biliaires, adhérer à la muqueuse intestinale, persister un certain temps dans le tractus intestinal, produire des substances anti-microbiennes et moduler le système immunitaire (Dunne et al., 2001). Cependant certains de ces critères comme l'adhérence et la viabilité sont remis en cause puisque des souches non viables, qui ne s'implantent pas dans la muqueuse et qui transitent dans la lumière, sont capables d'exercer des effets biologiques bénéfiques (Zhang et al., 2005).

Les micro-organismes probiotiques sont principalement représentés par des bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Toutefois, d'autres micro-organismes tels que la souche non pathogène *E. coli* Nissle 1917, certaines souches de *Bacillus subtilis* et certaines levures sont également considérés comme probiotiques. Des mélanges de bactéries, comme VSL#3, qui est constitué de 8 souches bactériennes, sont également commercialisés comme probiotiques.

Bien que par définition les probiotiques utilisés soient vivants au moment de l'administration, il existe peu d'information sur la viabilité des bactéries probiotiques au niveau des différentes parties de l'intestin. Cependant, différentes études ont montré que les probiotiques survivent de façon transitoire dans l'appareil digestif et sont retrouvés vivants dans les fèces (Matto et al., 2004; Rochet et al., 2008a; Rochet et al., 2008b). De ce fait, afin d'obtenir des effets bénéfiques, l'ingestion du probiotique doit être quotidienne et avec un

dosage minimal de l'ordre de  $10^8$  à  $10^{10}$  CFU afin que le probiotique atteigne  $10^7$  CFU viables dans le côlon (Reid et al., 2003; Stanton et al., 2001).

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. grasseri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	VSL#3 (4 souches de lactobacilles,
<i>L. plantarum</i>	<i>B. adolescentis</i>	3 souches de bifidobactéries, 1 souche
<i>L. johnsonii</i>		de <i>Streptococcus salivarius</i> sp
<i>L. paracasei</i> , <i>L. casei</i>		<i>thermophilus</i> )
<i>L. salivarius</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

**Tableau 4 : Les principaux micro-organismes utilisés comme probiotiques.**

## B. Effets bénéfiques identifiés

De nombreuses études ont examiné l'influence des probiotiques, utilisés seuls ou en combinaison, sur l'immuno-modulation et les pathologies inflammatoires ou infectieuses chez l'homme. Les principaux effets bénéfiques des probiotiques sont démontrés dans le traitement et la prévention d'infections entériques et de syndromes post-antibiotiques. En effet, les probiotiques diminuent la durée et la fréquence des diarrhées infectieuses ou associées aux antibiotiques (de Vrese and Marteau, 2007). Il a également été montré que les probiotiques réduisent l'incidence et la sévérité d'entéocolites nécrosantes chez le nourrisson (Franks, 2010), le risque de cancer colorectal (Fotiadis et al., 2008), les symptômes associés au syndrome du côlon irritable (Aragon et al., 2010; Marteau) et améliorent l'intolérance au lactose (Levri et al., 2005). Certaines souches de lactobacilles (ex *L. acidophilus* NCFM) favorisent l'expression de récepteurs  $\mu$ -opioïdes et cannabinoïdes chez les cellules épithéliales intestinales et confèrent un effet analgésique comparable à celui de la morphine (Rousseaux et al., 2007).

## C. Spécificité de souche

Les études cliniques portant sur l'efficacité des probiotiques ont mis en évidence des différences selon les espèces et les souches de probiotiques utilisées. Bien que les mécanismes d'action des probiotiques soient multiples, il a été montré que les bactéries lactiques présentent des capacités immuno-modulatrices variables selon les souches utilisées. Ainsi, en fonction des cytokines produites par les cellules immunes (PBMC, peripheral blood mononuclear cells ; MDC, monocyte-derived dendritic cells) les bactéries lactiques peuvent être classées en trois catégories : celles qui induisent une forte production d'IL-12 et peu d'IL-10, 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., 2007a). Une corrélation a également été observée entre les profils immunomodulateurs *in vitro* et les effets thérapeutiques des différentes souches dans un modèle murin de colite induit au TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique), les souches ayant un ratio IL-10/IL-12 élevé présentant les meilleures capacités anti-inflammatoires *in vivo* (Foligne et al., 2007a).

## **II. Utilisation des probiotiques dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin**

L'utilisation de dérivés aminosalicylés (acide 5-aminosalicylique (5-Asa) ou mésalazine), de corticoïdes, de composés immunosuppresseurs et d'antibiotiques dans le traitement des maladies inflammatoire chronique de l'intestin a pour principal objectif de réduire et de prévenir l'inflammation de la muqueuse intestinale. Cependant, malgré les progrès incontestables dans le traitement de ces maladies, en particulier par l'utilisation d'anticorps anti-TNF $\alpha$ , le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques reste justifié afin de pallier aux effets secondaires de certaines drogues ou à l'absence de réponse chez certains patients. Une altération de la composition du microbiote ayant été remarquée chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, notamment une réduction de la quantité de lactobacilles et bifidobactéries, l'utilisation de probiotiques a donc été évaluée comme alternative thérapeutique étant donné le caractère « naturel » et l'absence d'innocuité d'un tel traitement.

### **A. La rectocolite hémorragique**

Le traitement standard utilisé chez les patients présentant des poussées de rectocolite hémorragique d'intensité faible ou modérée est la molécule anti-inflammatoire acide 5-aminosalicylique ou mésalazine (Baumgart and Sandborn, 2007). Plusieurs études cliniques ont évalué l'efficacité des probiotiques dans le traitement de cette pathologie. Deux études réalisées en double aveugle chez des patients présentant la phase active de la maladie ont montré que le traitement par la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 présente la même efficacité que la mésalazine dans la diminution du nombre de rechutes (Kruis et al., 2004; Rembacken et al., 1999). *L. rhamnosus* GG présente également un effet équivalent à celui de la mésalazine dans le maintien en rémission des patients (Zocco et al., 2006). Une étude sur une petite cohorte de patients (n=10 par groupe) a démontré que l'ingestion journalière pendant un an d'un lait fermenté supplémenté en *Bifidobacterium breve*, *B. bifidum* et *L. acidophilus* associé au traitement conventionnel diminue l'exacerbation des symptômes de rectocolite hémorragique comparativement au traitement conventionnel seul (Ishikawa et

al., 2003). Ces résultats suggèrent donc un rôle thérapeutique des probiotiques dans le traitement de rectocolites hémorragiques actives.

## **B. Les pochites**

Les résultats les plus convaincants sur l'efficacité des probiotiques proviennent des essais cliniques réalisés pour le traitement de la pochite, une inflammation de la poche post anastomose iléo-annale survenant chez des patients atteints de rectocolite hémorragique ayant subi une coloprotectomie totale. En effet, l'administration pendant un an du mélange VSL#3 est efficace pour maintenir la rémission obtenue après administration d'antibiotiques, chez des patients présentant une pochite chronique (Mimura et al., 2004). De plus ce mélange de probiotiques prévient l'apparition de pochite dans la première année suivant l'anastomose iléo-annale (Gionchetti et al., 2000; Lammers et al., 2005). Une étude récente a mis en évidence que le traitement avec VSL#3 augmente considérablement le nombre de cellules Treg muqueuses chez des patients présentant une anastomose iléo-annale, indiquant un mécanisme d'action immunorégulateur (Pronio et al., 2008). En revanche, l'utilisation de *L. rhamnosus* GG en thérapie primaire s'est montrée inefficace dans l'amélioration de la pochite aiguë (Kuisma et al., 2003).

## **C. La maladie de Crohn**

Le potentiel thérapeutique des probiotiques dans le traitement de la maladie de Crohn reste encore incertain. Les essais cliniques disponibles ont été réalisés sur un nombre peu élevé de patients et montrent des résultats mitigés. Une étude, réalisée en double aveugle sur 11 patients atteints de maladie de Crohn active, indique que *L. rhamnosus* GG n'a aucune efficacité dans l'induction ou le maintien de la rémission des patients (Schultz et al., 2004). De même, une supplémentation avec cette bactérie ne prévient pas la récurrence endoscopique postopératoire (Prantera et al., 2002). Deux autres études, réalisées en double aveugle sur des cohortes de patients plus importantes (n=70-98), ont également indiqué que l'administration quotidienne de *L. johnsonii* LA1 est incapable d'empêcher les épisodes de rechutes post-opératoires (Marteau et al., 2006; Van Gossum et al., 2007). Cependant, quelques essais cliniques ont tout de même montré des effets thérapeutiques positifs. Une étude réalisée sur un faible échantillon de patients atteints de maladie de Crohn active (n=28) a montré que l'administration quotidienne de la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917, en plus de l'induction de la rémission par un traitement standard, diminue le pourcentage de rechute à 30% pour le groupe traité contre 70% pour le groupe placebo (Malchow, 1997). De même, une supplémentation par la levure *Saccharomyces boulardii* associée au traitement par la mésalazine favorise la rémission en réduisant significativement

le risque de récurrence, avec seulement 6,25% de rechute à 6 mois contre 37,5% pour le groupe traité avec la mésalazine seule (Guslandi et al., 2000). Il a également été montré que *S. boulardii* réduit l'hyperperméabilité intestinale observée chez les patients (Garcia Vilela et al., 2008). Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires pour étayer ces résultats controversés.

	Micro-organismes probiotiques	Méthodologie	Effets observés	Référence
Pochite	VSL#3	n=31, P	Prévention efficace	Pronio A, 2008
		n=23	Induction de la rémission	Gionchetti P, 2007
		n=36, P, R	Maintenance de la rémission	Mimura T, 2004
		n=40, P, R	Prévention efficace	Gionchetti P, 2003
		n=40, P, R	Maintenance de la rémission	Gionchetti P, 2000
	Produit laitier contenant des lactobacilles et des bifidobactéries	n=61	Réduction de l'inflammation histopathologique	Laake KO, 2005
	<i>L. rhamnosus</i> GG	n=117	Retard dans l'apparition de pochites	Gosselink MP, 2004
Rectocolite hémorragique	VSL#3	n=15	Induction de la rémission	Soo I, 2008
		n=32		Bibiloni R, 2005
		n=90, R	Meilleur que le 5-Asa ou balsalazide dans l'induction de la rémission	Tursi A, 2004
	Symbiotique ( <i>B. longum</i> et synergie 1)	n=18, R, P	Induction de la rémission	Furrie E, 2005
	Lait fermenté par des bifidobactéries	n=20, P, R		Kato K, 2004
		n=21, P, R	Maintenance de la rémission	Ishikawa H, 2003
	<i>Saccharomyces boulardii</i>	n=24	Induction de la rémission	Guslandi M, 2003
	<i>E. coli</i> Nissle	n=222, R	Effet équivalent au 5-Asa	Kruis W, 2004
		n=120, R		Rembacken BJ, 1999
Maladie de Crohn	Symbiotique (Lactobacilles, bifidobactéries et psyllium)	n=10	Réduction de la sévérité de la maladie	Fujimori S, 2007
	<i>Saccharomyces boulardii</i>	n=32	Meilleur que le 5-Asa seul dans la maintenance de la rémission	Guslandi M, 2000
	<i>E. coli</i> Nissle	n=24	Diminution du nombre de rechutes	Malchow HA, 1997

n : nombre de patients ; P : contrôle placebo ; R : étude randomisée

**Tableau 5 : Exemples d'essais cliniques sur l'utilisation des probiotiques dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.**

### III. Les mécanismes d'action des probiotiques

#### A. Influence des probiotiques sur la composition du microbiote

Il a été proposé que les probiotiques peuvent exercer leurs effets bénéfiques en modulant la composition du microbiote intestinal (Fuller, 1989). Un grand nombre d'études a ensuite supporté cette hypothèse en démontrant que l'ingestion de probiotiques provoque un changement dans la composition bactérienne. Par exemple, une augmentation du nombre de bifidobactéries et de lactobacilles ainsi qu'une diminution des entérobactéries sont observées chez des sujets sains après ingestion de *L. casei shirota* ou de *L. johnsonii* La1 (Spanhaak et al., 1998; Yamano et al., 2006). Chez des personnes âgées, la consommation de *B. lactis* HN019 augmente le nombre de bifidobactéries résidentes et réduit le nombre d'entérobactéries (Ahmed et al., 2007). Chez la souris, une augmentation

de la diversité des lactobacilles du côlon a été observée après l'administration de *L. casei* et *L. plantarum* (Fuentes et al., 2008).

Chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la composition du microbiote intestinal peut différer substantiellement de celle retrouvée chez les individus sains, notamment en présentant un nombre plus élevé d'espèces bactériennes potentiellement pro-inflammatoires (*Bacteroides vulgatus* et *E. coli*) ainsi qu'une diminution dans la diversité des Firmicutes (*F. prausnitzii*) et d'espèces bactériennes bénéfiques comme les bifidobactéries (Manichanh et al., 2006; Rehman et al., 2010; Sokol et al., 2009; Tamboli et al., 2004). Il a été montré qu'un lait fermenté contenant des bifidobactéries réduisait le nombre de *B. vulgatus* intestinaux chez des patients atteints de rectocolite hémorragique (Ishikawa et al., 2003). De plus, le mélange VSL#3 est capable d'augmenter le nombre total de bactéries et donc de moduler la diversité du microbiote intestinal chez des patients atteints de pouchite (Kuhbacher et al., 2006). Dans un modèle murin de colite chronique induite au DSS, VSL#3 peut également moduler la composition du microbiote en augmentant le nombre de bifidobactéries caecales (Gaudier et al., 2005). Ainsi, un des mécanismes possible par lequel les probiotiques peuvent atténuer la sévérité de la rectocolite hémorragique serait d'influencer la diversité des espèces bactériennes.

## **B. Les effets antimicrobiens des probiotiques**

### **1. Production de substances anti-bactériennes**

Les mécanismes impliqués dans la modification de la composition du microbiote intestinal incluent la production, par les probiotiques, d'une ou de plusieurs substances antimicrobiennes. Par exemple, la sécrétion d'acide lactique et/ou de peroxyde d'hydrogène par les lactobacilles inhibe, en diminuant le pH environnant, la croissance de bactéries entéropathogènes et uropathogènes (Cadieux et al., 2009; Makras et al., 2006). De nombreuses bactéries lactiques sécrètent également des bactériocines, des peptides antimicrobiens perméabilisant les membranes bactériennes ou interférant avec des enzymes de biosynthèse de la paroi bactérienne. Il a ainsi été montré que la production de la bactériocine Abp118 par *L. salivarius* UCC118 protège les souris d'une infection par la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes* (Corr et al., 2007).

### **2. Inhibition de l'adhésion et de l'invasion de bactéries pathogènes au niveau de l'épithélium intestinal**

Les probiotiques peuvent entrer en compétition avec les bactéries pathogènes au niveau des sites de fixation situés à la surface des cellules épithéliales et ainsi prévenir la colonisation de la muqueuse intestinale par ces bactéries. Il a été montré qu'en adhérant à une monocouche de cellules épithéliales (T84), *L. rhamnosus* et *L. acidophilus* sont capables

d'inhiber l'adhésion de souches de *E. coli* entéropathogènes et entérohémorragiques (Sherman et al., 2005). De même, la pré-colonisation de cellules épithéliales par diverses souches probiotiques inhibe l'adhésion, l'internalisation et la translocation au niveau basolatéral de *Campylobacter jejuni* (Alemka et al., 2010). Même si ces effets n'ont été observés qu'après un prétraitement des cellules épithéliales avec les différentes souches de probiotiques avant l'infection par les souches pathogènes, une autre étude réalisée *in vitro* a montré qu'une co-infection par la souche *L. casei* DN-114 001 est capable d'inhiber l'adhésion et l'invasion d'une souche de *E. coli* isolée de patients atteints de maladie de Crohn (Ingrassia et al., 2005).

En plus de ce mécanisme d'exclusion compétitive, les probiotiques favorisent la production de mucines, des glycoprotéines synthétisées par les cellules épithéliales qui protègent l'épithélium de la colonisation de pathogènes. En effet, certains lactobacilles comme *L. plantarum* 299v et *L. rhamnosus* GG sont capables d'augmenter, *in vitro*, l'expression génique de *MUC2* et *MUC3* ainsi que la sécrétion extracellulaire de mucines par les cellules épithéliales HT29, inhibant ainsi l'adhésion d'un *E. coli* entéropathogène (Mack et al., 2003; Mack et al., 1999). Une étude *in vivo* a montré que l'administration du mélange VSL#3 à des rats pendant 7 jours augmente la sécrétion de mucines ainsi que l'expression de *MUC2* au niveau de la lumière intestinale. De plus, les tests réalisés *in vitro* sur des cellules épithéliales de côlon suggèrent que ce sont les lactobacilles présents dans le mélange VSL#3 qui induiraient cette production de mucines (Caballero-Franco et al., 2007).

Les probiotiques peuvent également moduler la production de substances antimicrobiennes par les cellules de Paneth, ce qui empêche l'adhésion et l'invasion bactérienne. Il a notamment été montré que certains lactobacilles, le mélange VSL#3 et *E. coli* Nissle 1917 induisent, par un mécanisme dépendant des voies de signalisation AP1 (activator protein 1) et NF- $\kappa$ B, la production de  $\beta$ -défensines 2 par des cellules épithéliales intestinales humaines (Schlee et al., 2008; Schlee et al., 2007).

### **C. Effets des probiotiques sur le renforcement de la fonction barrière de l'épithélium**

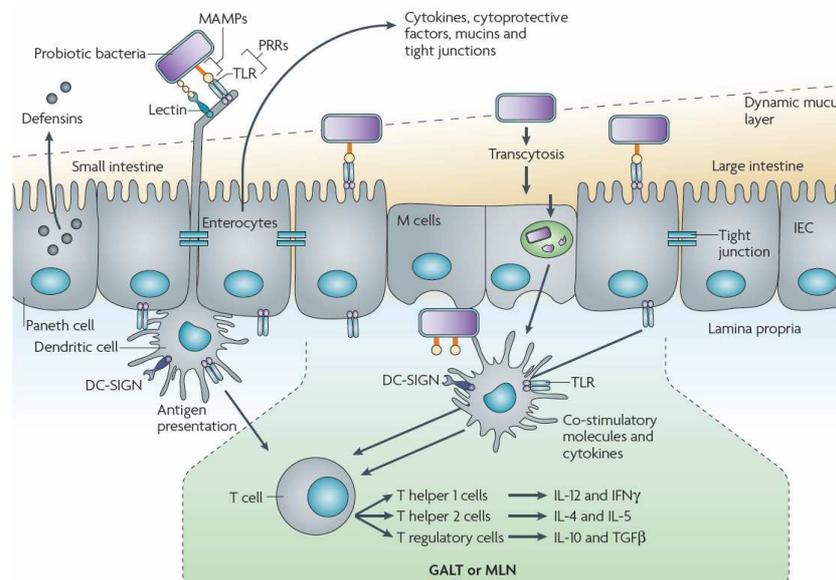
Les probiotiques favorisent l'intégrité de l'épithélium intestinal en exerçant un rôle protecteur sur la structure de l'épithélium. Il a été montré *in vitro* que *L. rhamnosus* GG favorise la survie de cellules de côlon humaines et murines en diminuant le nombre de cellules apoptotiques (Lam et al., 2007). La prévention de la destruction de l'épithélium induite par des médiateurs pro-inflammatoires, une caractéristique des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Sartor, 2006), peut également contribuer au renforcement de la fonction barrière de l'épithélium. En effet, il a récemment été démontré

que deux protéines sécrétées par *L. rhamnosus* GG, nommées p40 et p75, empêchent l'apoptose des cellules épithéliales humaines ou murines induite par le TNF $\alpha$  en activant la voie de signalisation de la protéine kinase B (PKB/Akt) et en inhibant la voie pro-apoptotique médiée par les MAPK (Yan et al., 2007; Yan and Polk, 2002).

Les probiotiques peuvent également initier la réparation de l'épithélium après sa détérioration. Par exemple, *E. coli* Nissle 1917 est capable d'augmenter l'expression de la protéine de jonction serrée ZO-2 (zonula occludens-2) et de diverses protéines kinases C chez des cellules T84 polarisées infectées par la souche de *E. coli* entéropathogène E2348/68, restaurant ainsi l'intégrité de l'épithélium (Zyrek et al., 2007). *L. casei* DN-114 001 et VSL#3 sont capables de maintenir la fonction barrière de l'épithélium par un mécanisme similaire (Otte and Podolsky, 2004; Parassol et al., 2005).

#### D. Modulation du système immunitaire inné et adaptatif par les probiotiques

Les probiotiques expriment à leur surface de nombreux ligands qui peuvent être reconnus par les récepteurs de l'hôte (récepteurs de type TLR, NLR ou lectines) et induire des voies de signalisation aboutissant à leurs effets bénéfiques. En interagissant avec les cellules épithéliales et les DC au niveau de la lumière intestinale, les probiotiques peuvent ainsi influencer sur l'activation de ces cellules et la polarisation de la réponse immunitaire adaptative (Figure 12).



**Figure 12 : Interaction entre les bactéries probiotiques et les cellules épithéliales et les cellules dendritiques du GALT.**

Les probiotiques ingérés sont reconnus différemment par les acteurs de la réponse immune en fonction de l'épaisseur de la couche de mucus. 1) Les DC de la *lamina propria* étendent des dendrites entre les cellules épithéliales pour détecter et capturer directement les probiotiques présents dans la lumière intestinale ; 2) Les probiotiques peuvent être pris en charge par les cellules M des plaques de Peyer et présentés aux DC du dôme sous-épithélial ; 3) Les probiotiques peuvent interagir directement avec les cellules épithéliales et moduler leur fonction. D'après Lebeer S et al, *Nature Reviews Microbiology* 2010.

## 1. Effet des probiotiques sur les cellules épithéliales intestinales

Les probiotiques peuvent influencer sur les productions cytokiniques des cellules épithéliales via la modulation de la voie NF- $\kappa$ B. Par exemple, en empêchant la dégradation d'I $\kappa$ B (inhibitor of kappa B) et de ce fait la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B, *L. reuteri* et *L. rhamnosus* GG inhibent la production d'IL-8 induite après stimulation des cellules épithéliales par le TNF $\alpha$  (Ma et al., 2004; Zhang et al., 2005). La souche *L. casei* DN-114 001 inhibe l'activation de la voie NF- $\kappa$ B consécutive à l'infection de cellules épithéliales Caco-2 par la bactérie entéro-invasive *Shigella flexneri* en empêchant la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  par le système ubiquitine/protéasome (Tien et al., 2006). De façon similaire, *B. infantis* 35624 et *L. salivarius* UCC118 diminuent la production d'IL-8 résultant de l'infection des cellules épithéliales HT29 par *Salmonella typhimurium* (O'Hara et al., 2006). Il a également été montré que *L. casei* DN-114 001, *L. bulgaricus* LB10 et *B. longum* diminuent la production d'IL-8 et de TNF $\alpha$  par des explants intestinaux de patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique après 24 heures de co-culture (Bai et al., 2006; Borruel et al., 2002; Llopis et al., 2009).

Les activités anti-inflammatoires des probiotiques peuvent également s'exercer par l'inhibition de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires ou par la libération de composants anti-inflammatoires par les cellules épithéliales. Ainsi, le mélange VSL#3 prévient la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire IP-10 (interferon-inducible protein 10) induite par le TNF $\alpha$  via un mécanisme de dégradation post-transcriptionnelle (Hoermannsperger et al., 2009) tandis que *L. reuteri* favorise la production, par les entérocytes, de NGF (nerve growth factor), un facteur de croissance présentant des propriétés anti-inflammatoires (Ma et al., 2004).

## 2. Effet des probiotiques sur les cellules denditiques

Les DC sont des cellules clés de la réponse immune dont l'activation différentielle permet d'orienter la polarisation de la réponse adaptative. Les DC humaines dérivées de monocytes de sang périphérique (MDC) ainsi que les DC murines dérivées de moelle osseuse (BMDC, bone marrow-derived dendritic cells) sont capables d'internaliser des lactobacilles par phagocytose (Foligne et al., 2007b; Mohamadzadeh et al., 2005). Diverses études ont montré que les probiotiques peuvent moduler, spécifiquement selon la souche utilisée, la maturation et les productions cytokiniques des DC (Christensen et al., 2002; Foligne et al., 2007b). Par exemple, alors que *L. rhamnosus* Lr32 et *L. salivarius* Ls33 n'induisent qu'une maturation partielle des BMDC, d'autres souches comme *L. acidophilus* NCFM et *Lactococcus lactis* MG1363 induisent une maturation totale des BMDC qui présentent une forte expression des marqueurs d'activation (CMH II) et de co-stimulation

(CD80/CD86 et CD40) et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et l'IL-6 (Foligne et al., 2007b). Il a également été montré que des BMDC (Drakes et al., 2004) ou des DC humaines purifiées du sang ou de la *lamina propria* (Hart et al., 2004) stimulées par le mélange VSL#3 produisent de grandes quantités d'IL-10 et peu d'IL-12. Cependant, toutes les souches composant ce mélange n'ont pas les mêmes capacités immuno-modulatrices. En effet, les bifidobactéries, *B. infantis* et *B. longum*, ont été identifiées comme les souches présentant les effets anti-inflammatoires les plus marqués en favorisant la production d'IL-10 et la diminution de l'expression des molécules de co-stimulation CD40 et CD80 des DC ainsi qu'une réduction de la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T (Hart et al., 2004).

### **3. Régulation de la fonction des lymphocytes T par les probiotiques**

#### **a. Modulation des réponses Th1, Th2 et Th17**

De nombreuses études *in vitro* ont montré que certains probiotiques peuvent influencer la polarisation de la réponse immune en favorisant la mise en place d'une réponse adaptative Th1 dominante. Par exemple, la stimulation de MDC par *L. gasseri*, *L. johnsonii* ou *L. reuteri* induit la sécrétion d'IL-12 et polarise les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en lymphocytes Th1 et T cytotoxiques producteurs d'IFN $\gamma$  (Mohamadzadeh et al., 2005). De plus, la stimulation de MDC de patients allergiques par l'antigène Derp1, en présence de *L. plantarum* NCIMB 8826, induit la production d'IL-12 et inhibe la sécrétion de cytokines Th2 par les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves autologues (Pochard et al., 2005). Chez la souris, l'administration de *E. coli* Nissle 1917 par voie intranasale ou intrapéritonéale inhibe le développement de réponses allergiques en favorisant, au niveau pulmonaire, le développement de lymphocytes Th1 producteurs d'IFN $\gamma$  (Bickert et al., 2009).

A l'inverse, d'autres études mettent en évidence la capacité des probiotiques à réguler la réponse immune. Braat et collaborateurs ont montré que des MDC stimulées *in vitro* avec *L. rhamnosus* diminuent la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et la sécrétion par ces cellules d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-10. De plus, chez l'homme, l'administration de *L. rhamnosus* pendant 2 semaines réduit la production d'IL-4 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez des individus sains et la sécrétion d'IFN $\gamma$  et d'IL-2 chez des patients souffrants de la maladie de Crohn indiquant que le mécanisme anti-inflammatoire du probiotique affecte à la fois les réponses immunes Th1 et Th2 (Braat et al., 2004). L'administration pendant 20 jours du mélange de bactéries probiotiques IRT5 (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *B. bifidum* et *Streptococcus thermophilus*) provoque une hyporéactivité des lymphocytes T et B sans provoquer leur apoptose et une diminution de l'expression de cytokines Th1, Th2 et Th17 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Kwon et al., 2010). Récemment, il a également été montré que

*B. infantis* inhibe la production d'IL-17 par des splénocytes murins stimulés avec du TGFβ et de l'IL-6 et par des explants de côlon cultivés en présence de DSS (Tanabe et al., 2008).

### **b. Induction de lymphocytes T régulateurs**

De nombreux travaux ont corrélé l'effet immunomodulateur des probiotiques à l'induction de Treg et de DC régulatrices. *L. salivarius* Ls33 et *L. rhamnosus* Lr32 favorisent la différenciation de DC tolérogènes *in vitro*, capables de protéger des souris d'une colite induite au TNBS après transfert adoptif. Ces effets protecteurs, dépendants des voies de signalisation NOD2 et TLR2, semblent impliquer l'induction de Treg naturels CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Foligne et al., 2007b). En interagissant avec la lectine DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), *L. reuteri* ASM20016 et *L. casei* NIZO B255 induisent, *in vitro*, la différenciation de MDC naïves en MDC régulatrices favorisant le développement de Treg producteurs de l'IL-10 (Smits et al., 2005). Des MDC immatures stimulées avec *L. casei* DN-114 001 et *B. animalis* DN-173 010 favorisent la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes Treg à faible capacité proliférative exprimant fortement GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related gene) et produisant peu de cytokines. Cette nouvelle catégorie de Treg FoxP3<sup>low</sup>CD25<sup>low</sup>, distincte des Treg Tr1 et des Treg naturels CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>high</sup>, présente des capacités suppressives sur la prolifération et la production d'IFNγ de lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs allogéniques (Baba et al., 2008).

La génération des lymphocytes Treg par les probiotiques joue un rôle dans le contrôle de l'inflammation. Dans un modèle murin de colite au TNBS, l'administration du mélange VSL#3 améliore les symptômes des souris en favorisant la prolifération de lymphocytes CD4<sup>+</sup> Treg exprimant du TGFβ membranaire (Di Giacinto et al., 2005). De même, dans un modèle d'asthme murin, l'atténuation des symptômes allergiques suite à l'administration de *L. rhamnosus* GG et *B. lactis* Bb12 est corrélée au développement de Treg sécrétant du TGFβ (Feleszko et al., 2007). L'administration orale du mélange de probiotiques IRT5 augmente le nombre de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> au niveau des ganglions mésentériques et favorise l'effet immunosuppresseur des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. De plus, la conversion des cellules T CD4<sup>+</sup> en Treg FoxP3<sup>+</sup> est favorisée par des DC régulatrices exprimant les gènes codant pour l'IL-10, le TGFβ et l'enzyme immunosuppressiveIDO (Kwon et al., 2010).

### **c. Redistribution des cellules T**

Une étude, réalisée dans un modèle de colite inflammatoire (transfert de cellules T CD4<sup>+</sup>CD45Rb<sup>high</sup> chez les souris immunodéficientes SCID), a démontré que les capacités anti-inflammatoires de *S. boulardii* sont corrélées à une altération de la migration des lymphocytes T producteurs d'IFN $\gamma$  vers la muqueuse colique. En effet, un produit de sécrétion de cette levure favorise l'adhésion des cellules T effectrices aux cellules endothéliales des ganglions mésentériques, limitant ainsi l'infiltration des lymphocytes Th1 dans le côlon et l'amplification de l'inflammation par la libération de cytokines pro-inflammatoires (Dalmasso et al., 2006).

## **IV. Les composants bactériens exerçant l'immuno-modulation**

De nombreuses études se sont intéressées à l'identification des composants responsables des effets bénéfiques des probiotiques.

### **A. L'ADN**

L'ADN des bactéries probiotiques peut moduler les fonctions immunes chez l'homme et la souris. En présence de stimuli pro-inflammatoires, l'ADN isolé du mélange VSL#3 inhibe la sécrétion d'IL-8 et diminue l'activation de la MAPK p38 et de NF- $\kappa$ B chez les cellules épithéliales HT29. De plus, dans le modèle de colite spontanée chez les souris IL-10<sup>-/-</sup>, l'administration orale de l'ADN de ce mélange de probiotiques diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) et améliore le score histologique d'inflammation au niveau du côlon (Jijon et al., 2004).

Les séquences d'ADN contenant des motifs CpG non méthylés, retrouvées dans le génome de certaines espèces bactériennes et virales, activent l'immunité innée via le TLR9. Rachmilewitz et collaborateurs ont démontré que l'administration de l'ADN non méthylé du mélange VSL#3 prévient la colite induite par le DSS via un mécanisme dépendant du TLR9 (Rachmilewitz et al., 2004). Cet effet protecteur pourrait être lié à la production d'IFN de type I (Katakura et al., 2005).

### **B. Les surnageants de culture**

Certains travaux ont étudié les capacités protectrices des métabolites produits par les probiotiques. Les facteurs solubles présents dans le surnageant de culture de *B. breve* C50 présentent des capacités anti-inflammatoires 1) *in vitro* en inhibant la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les cellules mononucléées humaines ou de cellules épithéliales et 2) *in vivo* en protégeant les souris d'une colite induite au TNBS (Heuvelin et al., 2009; Menard et al., 2004). De plus, Hoarau et collaborateurs ont montré

que ce surnageant pouvait également moduler la fonction et la survie des MDC. En effet, il induit la maturation et la survie des MDC en interagissant avec le TLR2 et favorise la production d'IL-10 par ces cellules (Hoarau et al., 2006). La modulation de la fonction des DC résulterait de l'activation de différentes voies de signalisation impliquant différentes kinases : la voie p38 MAPK, la voie des PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et la voie ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) (Hoarau et al., 2008). L'administration orale du surnageant de *B. infantis* à des souris IL-10<sup>-/-</sup> réduit la perméabilité colique, atténue l'inflammation du côlon et diminue la production d'IFN $\gamma$  au niveau du côlon et de la rate (Ewaschuk et al., 2008). Dans un modèle de colite induite par du DSS, le gavage des souris avec le surnageant de *L. plantarum* HY115 et *L. brevis* HY7401 diminue la réduction du côlon, l'activité myéloperoxydase et l'activation de NF- $\kappa$ B (Lee et al., 2008). Le groupe de K. Madsen a également montré que le surnageant de culture de VSL#3 est capable de convertir, au niveau de cellules épithéliales intestinales, l'acide linoléique en acide linoléique conjugué, un isomère présentant des propriétés anti-inflammatoires (Ewaschuk et al., 2006). De plus, Petrof et collaborateurs ont montré que ce surnageant peut avoir un double effet anti-inflammatoire en inhibant l'activation de NF- $\kappa$ B et en induisant la production de protéines de choc thermique (heat shock protein) (Petrof et al., 2004). Enfin, le surnageant de culture de *F. prausnitzii*, une bactérie dominante du microbiote intestinal, dont la présence est fortement réduite chez les patients atteints de maladie de Crohn, inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B chez des cellules caco-2 stimulées par de l'IL-1 $\beta$  et diminue la sévérité de la colite chez des souris traitées au TNBS (Sokol et al., 2008). Néanmoins la nature exacte de ces facteurs solubles n'a pas été identifiée à ce jour.

### **C. Les composants de paroi**

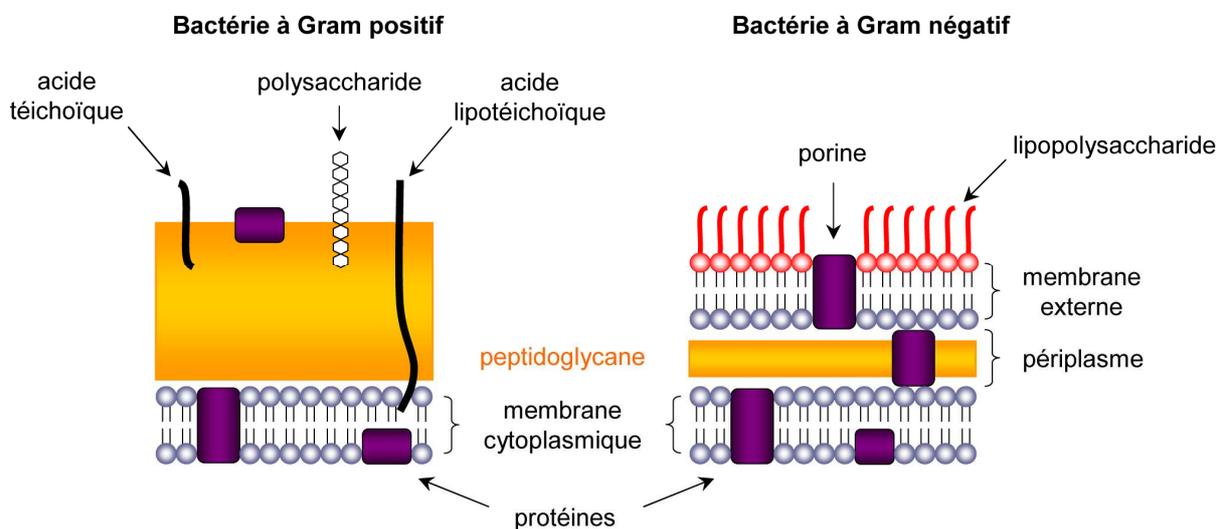
La paroi est un composant majeur de la structure des bactéries et le peptidoglycane peut représenter jusqu'à plus de la moitié de la masse chez les bactéries à Gram positif. Les nombreux composants de surface, tels que le LPS, les LTA, les (exo)polysaccharides, les lipoprotéines et le peptidoglycane sont les principaux composants reconnus par les récepteurs de l'immunité innée et donc capables d'initier des réponses immunes. Des études récentes ont démontré que la composition de la paroi peut jouer un rôle dans les capacités anti-inflammatoires des bactéries probiotiques. En effet, une mutation affectant la biosynthèse des acides téichoïques modifie le profil immunomodulateur d'une souche de *L. plantarum* en augmentant ses capacités anti-inflammatoires *in vitro* sur cellules mononucléées de sang humain et *in vivo* dans le modèle de colite au TNBS (Grangette et al., 2005). De plus, il a été observé qu'une mutation empêchant la synthèse de la protéine de surface SlpA chez *L. acidophilus* NCFM provoque une augmentation de la production de

cytokines pro-inflammatoires par des DC humaines en diminuant les capacités de la souche à fixer DC-SIGN (Konstantinov et al., 2008). Il a également été montré que le polysaccharide A (PSA) de la bactérie commensale *Bacteroides fragilis* exerce un effet protecteur dans deux modèles de colite expérimentale (TNBS et transfert de cellules T CD4<sup>+</sup>CD45Rb<sup>high</sup> chez des souris SCID) via la génération de Treg FoxP3<sup>+</sup> produisant de l'IL-10 (Mazmanian et al., 2005; Round and Mazmanian, 2010). Le complexe polysaccharide-peptidoglycane de *L. casei* Shirota inhibe la production d'IL-6 par des PBMC de patients atteints de rectocolite hémorragique stimulées par le LPS et par des lymphocytes de *lamina propria* purifiés de souris avec une iléite chronique (Matsumoto et al., 2009).

## Chapitre 4 : Le peptidoglycane

### I. Structure et fonction du peptidoglycane

Le peptidoglycane ou muréine est un élément structural essentiel et spécifique de la paroi de la plupart des bactéries. Constitué de chaînes glycaniques reliées par de courts peptides, il forme une structure rigide entourant la membrane cytoplasmique bactérienne. Sa principale fonction est de préserver l'intégrité de la bactérie en luttant contre la pression osmotique. En effet, une inhibition de sa biosynthèse ou sa dégradation durant la croissance bactérienne provoque une lyse osmotique de la cellule. Le peptidoglycane contribue également au maintien de la forme de la bactérie, à la croissance et à la division cellulaire et constitue un point d'ancrage à d'autres composants de la paroi comme les acides téichoïques, les protéines et les polysaccharides. Alors que les bactéries à Gram positif présentent une épaisse couche de peptidoglycane qui représente environ la moitié de la masse de leur paroi, les bactéries à Gram négatif arborent une fine couche de peptidoglycane entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe (Figure 13). Le peptidoglycane ainsi que l'arsenal génétique nécessaire à sa biosynthèse sont absents chez les mycoplasmes, les *Planctomycetes* et chez l'agent du « typhus des broussailles », *Orientia tsutsugamushi*. Du peptidoglycane n'a jamais été détecté chez les *Chlamidiae* bien que la plupart des gènes de biosynthèse soit présente dans leur génome.

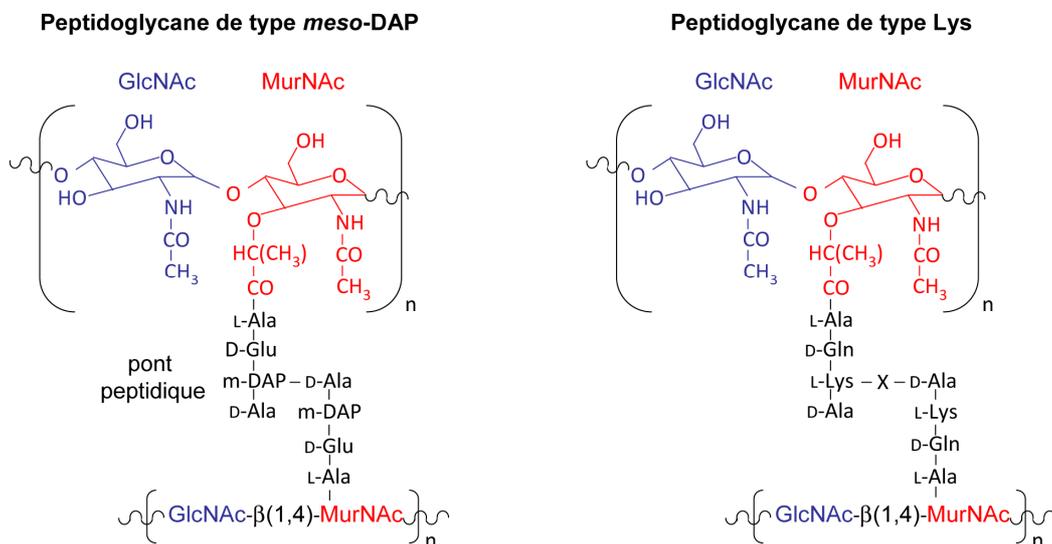


**Figure 13 : Représentation schématique de la paroi bactérienne.**

Les bactéries à Gram positif possèdent une épaisse couche de peptidoglycane décorée par des acides téichoïques et lipotéichoïques, des polysaccharides et des protéines. La paroi des bactéries à Gram négatif est caractérisée par une fine couche de peptidoglycane au niveau du périplasma et par la présence du lipopolysaccharide au niveau de la membrane externe.

## A. Organisation structurale du peptidoglycane

Le peptidoglycane est un polymère saccharidique alternant les groupements N-acétylglucosamine (GlcNAc) et acide N-acétylmuramique (MurNAc) reliés par des liaisons  $\beta(1-4)$ . Chez le peptidoglycane naissant, le groupement carboxyle de chaque résidu MurNAc est substitué par un pentapeptide constitué d'une alternance d'acides aminés L et D : L-Alanine - D-Glutamate ou D-isoGlutamine - acide *meso*-diaminopimélique ou L-Lysine - D-Alanine - D-Alanine. La structure des chaînes glycaniques est relativement bien conservée entre les bactéries mais d'importantes variations sont retrouvées dans la nature des acides aminés constituant les peptides. Les bactéries à Gram négatif et certains bacilles à Gram positif (ex les espèces *Bacillus* et *Listeria*) ont un acide *meso*-diaminopimélique (peptidoglycane de type *meso*-DAP) en position 3 alors que la majorité des bactéries à Gram positif présentent une Lysine (peptidoglycane de type Lys). Le dernier résidu D-Alanine du pont peptidique est perdu chez le peptidoglycane mature. Les ponts peptidiques des peptidoglycanes de type *meso*-DAP sont généralement reliés directement entre eux alors que chez les peptidoglycanes de type Lys ils sont reliés par un peptide dont la taille et la composition en acides aminés varient selon les espèces bactériennes. Par exemple, on retrouve un pentaglycine chez *Staphylococcus aureus* alors qu'une asparagine est retrouvée chez les lactobacilles *L. salivarius* Ls33 et *L. acidophilus* NCFM.



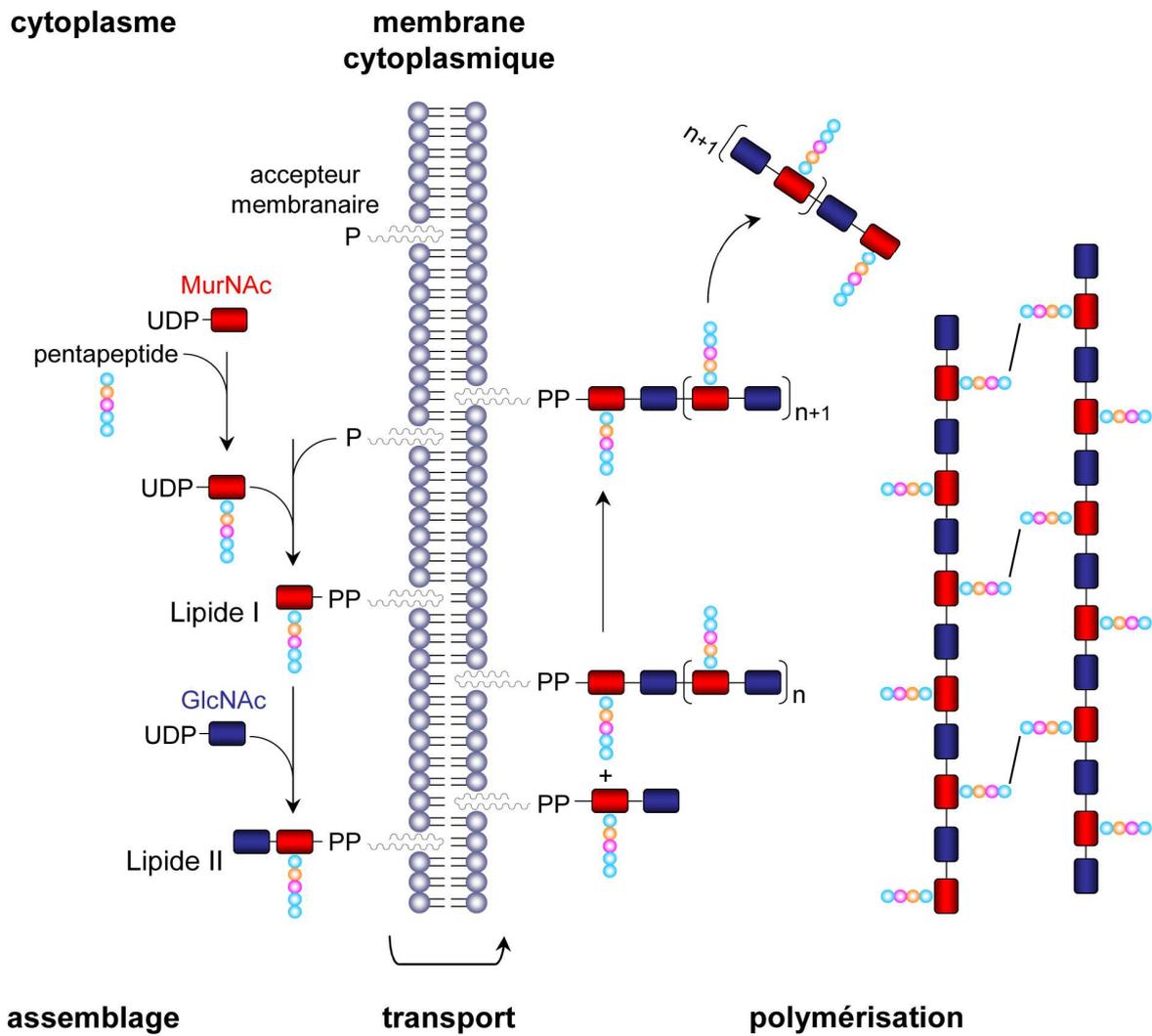
**Figure 14 : Structure du peptidoglycane.**

Le peptidoglycane est un polymère alternant les groupements N-acétylglucosamine (GlcNAc) et acide N-acétylmuramique (MurNAc) reliés entre eux par de courts peptides. La nature des acides aminés constituant ces ponts peptidiques permet de classer les peptidoglycanes en deux types. Chez les bactéries à Gram négatif et chez certains bacilles à Gram positif un résidu acide *meso*-diaminopimélique est retrouvé en 3<sup>ème</sup> position (peptidoglycane de type *meso*-DAP). La plupart des bactéries à Gram positif présente une L-Lysine en position 3 (peptidoglycane de type Lys). Chez les peptidoglycanes de type Lys, un ou plusieurs acides aminés (X) peuvent relier les peptides de deux chaînes glycaniques distinctes.

L'arrangement tridimensionnel du peptidoglycane dans la paroi est controversé. Le modèle classique « en couche » propose que les chaînes glycaniques et les ponts peptidiques soient parallèles à la membrane cytoplasmique (Pink et al., 2000). Le second modèle suggère que les chaînes glycaniques sont perpendiculaires à la membrane alors que les peptides sont parallèles à la surface cellulaire (Meroueh et al., 2006). En 2008, deux études ont décrit l'architecture du peptidoglycane d'espèces Gram négatives (Gan et al., 2008) et de la bactérie à Gram positif *Bacillus subtilis* (Hayhurst et al., 2008). Bien qu'une architecture en « couche » soit retrouvée chez les bactéries à Gram négatif, la situation apparaît plus complexe chez *Bacillus subtilis*.

## **B. Biosynthèse du peptidoglycane**

Le peptidoglycane est une macromolécule dynamique continuellement remodelée afin de permettre la croissance et la division cellulaire. Sa biosynthèse s'effectue en trois grandes étapes : la formation d'un monomère disaccharide-pentapeptide (lipide II) dans le cytoplasme, le transfert du côté externe de la membrane cytoplasmique du lipide II et la polymérisation des chaînes glycaniques du côté externe de la membrane cytoplasmique. Des précurseurs UDP-MurNAc et UDP-GlcNAc sont synthétisés dans le cytoplasme. Les cinq acides aminés constituant le peptide sont ajoutés successivement sur le précurseur UDP-MurNAc. La partie phosphoro-MurNAc-pentapeptide du précurseur UDP-MurNAc-pentapeptide est ensuite transférée sur l'accepteur membranaire bactoprénol pour former le lipide I (MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprénol). L'ajout du groupement GlcNAc du précurseur UDP-GlcNAc au lipide I permet la formation du lipide II (GlcNAc- $\beta$ (1-4)-MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprénol). Le lipide II est ensuite transporté au travers de la membrane cytoplasmique. L'incorporation et la réticulation des unités disaccharides-peptides, dans le squelette du peptidoglycane présent à la face externe de la membrane cytoplasmique, s'effectuent par des réactions de transglycosylation et de transpeptidation responsables respectivement de la formation des ponts glycosidiques et peptidiques (Delcour et al., 1999; Scheffers and Pinho, 2005).



**Figure 15 : Biosynthèse du peptidoglycane.**

Schématiquement, la biosynthèse du peptidoglycane s'effectue en trois étapes : 1) la formation d'un complexe GlcNAc-MurNAc-pentapeptide, 2) le transport de ce complexe au travers de la membrane plasmique et 3) l'incorporation du complexe dans le peptidoglycane préexistant.

## **II. Reconnaissance du peptidoglycane chez les mammifères**

Le peptidoglycane est une excellente cible pour la reconnaissance du système immunitaire puisqu'il est un composant essentiel de la paroi bactérienne et est absent des cellules eucaryotes. Il est reconnu par de nombreuses molécules du système immunitaire inné.

### **A. Reconnaissance controversée du peptidoglycane par le TLR2**

En 1999, de nombreuses études ont indiqué que le TLR2, en association avec le CD14, pouvait être un récepteur pour le peptidoglycane (Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Yoshimura et al., 1999). Il a également été montré que des cellules déficientes pour le TLR2 sont incapables de détecter le peptidoglycane (Akira et al., 2001). Ces travaux ont été réalisés avec des préparations de peptidoglycane commerciales et il a été rapidement mis en évidence que du peptidoglycane hautement purifié n'activait pas le TLR2, l'activité via ce récepteur résultant plutôt de la présence de contaminants agonistes du TLR2 (acides lipotéichoïques ou lipoprotéines) dans les préparations (Travassos et al., 2004). Ces résultats ont d'ailleurs été confortés par le fait que le peptidoglycane purifié d'une souche de *Staphylococcus aureus* ne possédant pas de lipoprotéines (mutant  $\Delta$ lgt) n'était plus capable d'activer le TLR2 (Volz et al., 2010). De plus, des mucopeptides, les produits de dégradation du peptidoglycane responsables de son activité biologique, ne sont pas détectés par le TLR2 (Inamura et al., 2006; Volz et al., 2010). Des études récentes soutiennent cependant que du peptidoglycane hautement purifié est bien un agoniste de TLR2 (Asong et al., 2009; Dziarski and Gupta, 2005; Muller-Anstett et al., 2010).

### **B. Reconnaissance du peptidoglycane par les PGRP (Peptidoglycan Recognition Proteins)**

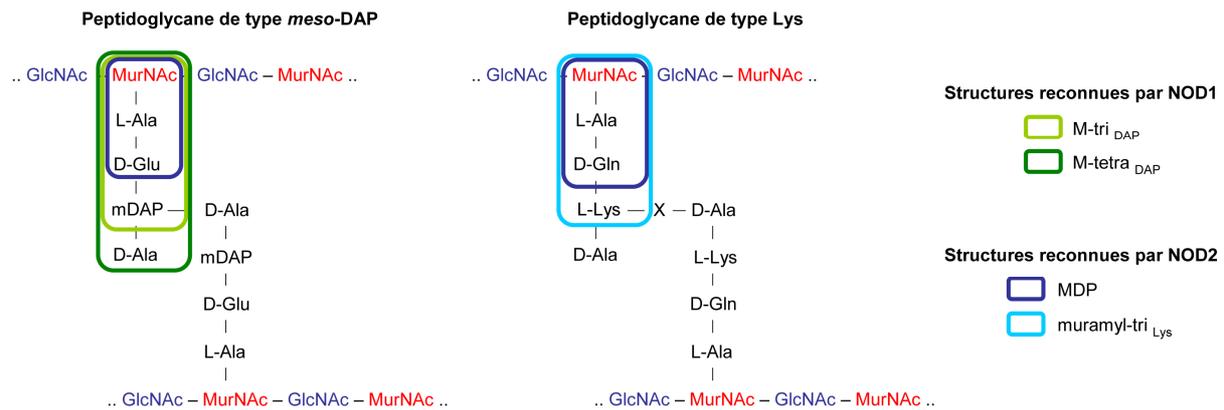
Les PGRP sont des protéines conservées entre les insectes et les mammifères qui reconnaissent le peptidoglycane et participent à l'immunité antimicrobienne. Chez les insectes, les PGRP favorisent la production de peptides antimicrobiens, la phagocytose, l'hydrolyse du peptidoglycane et participent à la régulation de réponses immunes (Royet and Dziarski, 2007). Les quatre PGRP (PGLYRP-1, PGLYRP-2, PGLYRP-3 et PGLYRP-4) identifiées chez les mammifères présentent un nombre plus restreint de fonctions. PGLYRP-1, retrouvée dans les granules des leucocytes (Tydell et al., 2002) et exprimée par les cellules M des plaques de Peyer de la muqueuse intestinale (Lo et al., 2003), ainsi que PGLYRP-3 et PGLYRP-4, localisées dans les tissus en contact avec l'environnement (peau, yeux, cavité orale, tube digestif) présentent une activité bactéricide directe contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Lu et al., 2006; Wang et al., 2007). Au contraire, PGLYRP-2, qui est exprimée constitutivement dans le foie et sécrétée dans la circulation

sanguine, est une amidase qui hydrolyse le peptidoglycane entre le groupement acide N-acétylmuramique et l'alanine du pont peptidique, détruisant ainsi la structure reconnue par NOD2, le MDP (Gelius et al., 2003; Wang et al., 2003). L'expression de PGLYRP-2 dans les tissus extra-hépatiques comme la peau peut être induite par des bactéries (Li et al., 2006; Wang et al., 2005) ou du MDP. Plus récemment, il a été montré que les PGRP fonctionnent également comme des modulateurs de l'inflammation et qu'ils coopèrent avec d'autres récepteurs de l'immunité innée (NOD2 et TLR4) pour induire une inflammation locale (Saha et al., 2009).

Des études cristallographiques ont révélé que les PGRP, qui présentent un site de fixation du peptidoglycane conservé, peuvent discriminer les peptidoglycanes de type Lys des peptidoglycanes de type *meso*-DAP. Ainsi, PGLYRP-3 se lie avec une plus forte affinité au peptidoglycane de type *meso*-DAP alors que PGLYRP-1 se lie préférentiellement au peptidoglycane de type Lys (Royet and Dziarski, 2007).

### **C. Reconnaissance du peptidoglycane par NOD2**

Le peptidoglycane est reconnu principalement par deux récepteurs de la famille des NLR identifiés au début des années 2000, NOD1 et NOD2. NOD1 est exprimé par tous les types cellulaires (Inohara et al., 1999) et reconnaît le peptidoglycane de type *meso*-DAP retrouvé essentiellement chez les bactéries à Gram négatif et chez quelques bactéries à Gram positif comme les espèces *Bacillus* et *Listeria monocytogenes* (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003a). La détection du *meso*-DAP du pont peptidique par NOD1 ne nécessite pas la présence du MurNAc (Magalhaes et al., 2005). NOD2 est retrouvé chez les cellules myélomonocytaires comme les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales intestinales (Gutierrez et al., 2002; Ogura et al., 2001b; Ogura et al., 2003). Ce récepteur est un senseur général des bactéries à Gram positif et à Gram négatif puisqu'il reconnaît la structure minimale commune à tous les peptidoglycanes : le MDP (Girardin et al., 2003b; Inohara et al., 2003). D'autres analyses sur l'identification des structures du peptidoglycane reconnues par NOD2 ont révélé que ce récepteur est également activé par le muramyl-tri<sub>Lys</sub> (Girardin et al., 2003c). Plus récemment, il a été montré que NOD2 pouvait participer à la défense antivirale de l'hôte en induisant la production d'IFN de type I après reconnaissance d'ARN simple brin viral (Sabbah et al., 2009).



**Figure 16 : Structures reconnues par NOD1 et NOD2.**

NOD2 reconnaît le muramyl dipeptide (MDP), la structure minimale commune à tous les peptidoglycane, ainsi que le muramyl-tri<sub>Lys</sub> des peptidoglycane de type Lys, alors que NOD1 reconnaît des muopeptides du peptidoglycane de type *meso*-DAP, M-tri<sub>DAP</sub> et M-tetra<sub>DAP</sub>.

Puisque les NLR sont des récepteurs cytosoliques, il a tout d'abord été supposé que les protéines NOD reconnaissent des pathogènes intracellulaires (Ferwerda et al., 2005; Girardin et al., 2001; Shimada et al., 2009). Cependant, de nombreuses études ont montré que NOD1 et NOD2 peuvent également reconnaître des pathogènes extracellulaires et que ces récepteurs participent à la réponse immunitaire contre ces micro-organismes (Deshmukh et al., 2009; Opitz et al., 2004; Zola et al., 2008). Même si les mécanismes par lesquels les produits de dégradation du peptidoglycane parviennent jusqu'aux récepteurs NOD ne sont pas encore clairement élucidés, certaines hypothèses ont été émises en fonction du type cellulaire et de la bactérie impliqués.

Le premier mécanisme concerne les bactéries invasives, qui après leur internalisation dans les cellules s'échappent de la vacuole et se répliquent dans le cytosol. Durant la croissance bactérienne, le peptidoglycane est continuellement renouvelé. Chez certaines bactéries à Gram négatif la dégradation du peptidoglycane, par les transglycosidases et les peptidases, libère des fragments dans le périplasma qui sont ensuite réimportés dans le cytoplasme de la bactérie pour y être recyclé (Cloud-Hansen et al., 2006). Cependant, une partie infime de ces fragments de peptidoglycane peut être exportée dans le cytosol des cellules infectées. Ainsi, la reconnaissance par NOD1 des muopeptides libérés par *Shigella* dans les cellules épithéliales active la voie NF-κB (Nigro et al., 2008). Des muopeptides peuvent également être libérés par des bactéries à Gram positif invasives. En effet, le ligand de NOD2, le MDP, peut être libéré par *Listeria monocytogenes* dans le cytoplasme des cellules infectées après clivage du peptidoglycane par des autolysines (Lenz et al., 2003).

Le second mécanisme permettant la libération de MAMP dans le cytoplasme implique le phénomène de phagocytose par les cellules présentatrices d'antigène. Ainsi, NOD2 est activé dans les macrophages stimulés avec des ligands bactériens générés dans les

phagolysosomes (Herskovits et al., 2007). Ce processus de phagocytose nécessite un recrutement des TLR et l'adaptateur MyD88 (Blander, 2007; Blander and Medzhitov, 2004).

Le MDP extracellulaire peut accéder au cytoplasme des cellules épithéliales soit par les transporteurs de di- ou tripeptides PepT1 et PepT2 (Charriere et al., 2010; Ismail et al., 2006) soit par une endocytose dépendante de la clathrine et de la dynamine (Lee et al., 2009; Marina-Garcia et al., 2009).

La localisation subcellulaire de NOD2 a également été étudiée. En plus de sa localisation cytoplasmique, NOD2 est associé à la membrane plasmique des cellules épithéliales et monocytaires (Barnich et al., 2005; Eitel et al., 2008; Kufer et al., 2006; Lecine et al., 2007; McDonald et al., 2005). De façon intéressante, NOD2 est retrouvé au niveau de la membrane basale des cellules épithéliales intestinales polarisées (McDonald et al., 2005). Des cellules monocytaires stimulées avec du MDP présentent une affectation de NOD2 à la membrane par un mécanisme dépendant de Rac1 (Eitel et al., 2008). De même, NOD1 et NOD2 sont recrutés au niveau des sites d'invasion de *Shigella flexneri* probablement via un mécanisme dépendant du cytosquelette d'actine (Kufer et al., 2008; Kufer et al., 2006). Ce recrutement de NOD2 au niveau de la membrane peut être une stratégie pour assurer une proximité entre le récepteur et son ligand durant une invasion bactérienne ou une endocytose du MDP. En effet, NOD2 favorise le recrutement de RICK impliquée dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Lecine et al., 2007). Cette compartimentation membranaire semble être requise pour une activation optimale des complexe NOD2-RICK et a déjà été décrite pour les TLR membranaire et le récepteur TNFR1 (Ea et al., 2006; Liew et al., 2005).

### **III. Reconnaissance des mucopeptides dérivés du peptidoglycane par NOD2 : dualité entre l'induction d'une réponse inflammatoire et la modulation de la réponse immune**

Le peptidoglycane est une des principales molécules microbiennes activatrices du système immunitaire des mammifères. Bien que la reconnaissance du peptidoglycane polymérique soit encore en débat, il est clairement établi que les fragments monomériques dérivés du peptidoglycane lors du renouvellement (turn-over) de la paroi ou après dégradation par des enzymes comme le lysozyme produit par les cellules de Paneth, les macrophages et les neutrophiles, sont reconnus par les récepteurs cytosoliques NOD1 et NOD2 et sont responsables de l'effet biologique du peptidoglycane.

## **A. Mise en place d'une réponse immunitaire pro-inflammatoire**

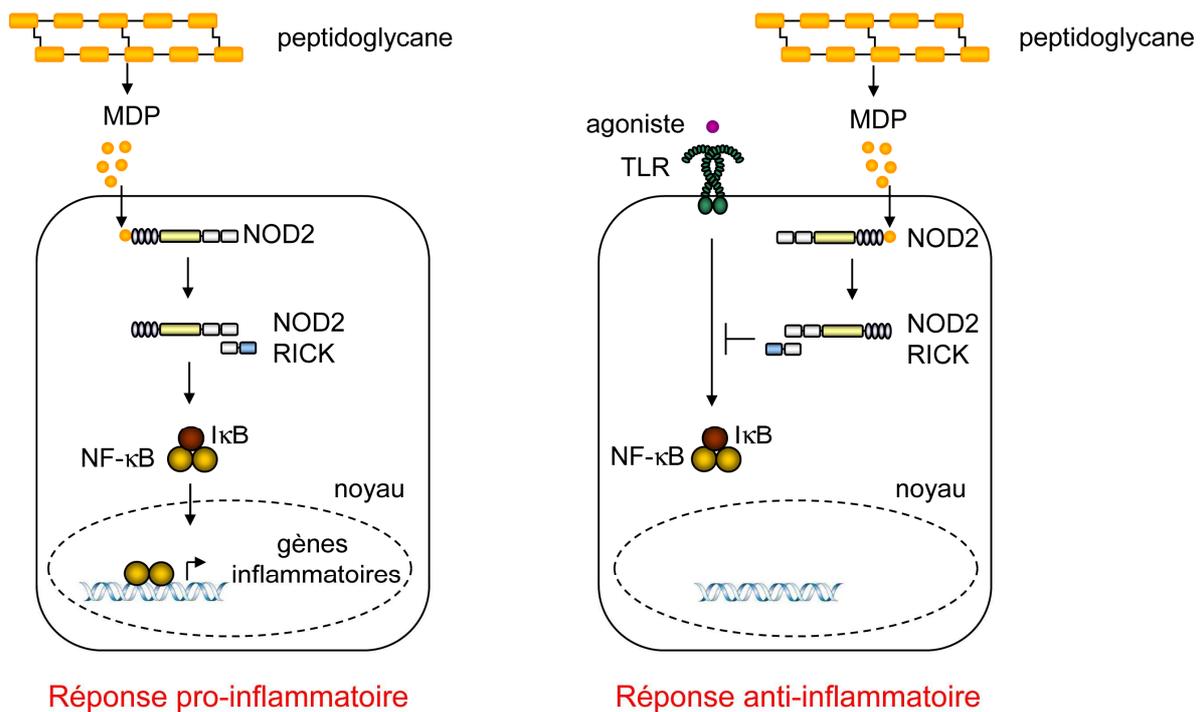
Dans les cellules résidentes, NOD2 est sous une forme auto-inhibée (Ogura et al., 2001b). Lors de la stimulation par le MDP, NOD2 s'oligomérisé et recrute la sérine thréonine kinase kinase RICK par une interaction CARD-CARD. RICK va ensuite activer une cascade de signalisation aboutissant à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. La reconnaissance du MDP par NOD2 peut également aboutir à l'activation des MAPK p38, ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) et JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Windheim et al., 2007). Les voies NF- $\kappa$ B et MAPK contribuent à la réponse immune et à l'inflammation induite par NOD2. Des études *in vitro* ont montré que l'activation des cellules épithéliales humaines par le MDP induit la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6), de chimiokines (IL-8, MCP-1) et de peptides anti-microbiens (Tattoli et al., 2007). Au sein des cellules présentatrices d'antigène, l'activation de NOD2 provoque la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-12) et les chimiokines IL-8 et RANTES (Tattoli et al., 2007; Werts et al., 2007).

La coactivation de NOD2 et des TLR augmente la production de médiateurs pro-inflammatoires. En effet, une co-stimulation avec du MDP et les agonistes des TLR 2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 et TLR9 augmente la production de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-8 par les macrophages (Netea et al., 2005; Pauleau and Murray, 2003).

## **B. Régulation de la réponse immune**

Des travaux récents ont néanmoins démontré que la stimulation chronique de NOD2 diminue la production de médiateurs pro-inflammatoires par des macrophages humains après stimulation par les agonistes des TLR2 et TLR4 (Hedl et al., 2007; Kullberg et al., 2008). Ces résultats supportent l'hypothèse que NOD2 favoriserait la tolérance immunitaire envers les produits bactériens chez l'homme et la souris. Il a également été montré que NOD2 inhibe une réponse inflammatoire, initiée après l'activation du TLR2, en bloquant la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (Watanabe et al., 2004; Watanabe et al., 2006; Yang et al., 2007). L'administration de MDP est capable de protéger les souris d'une colite expérimentale induite par du TNBS ou du DSS en inhibant les voies de signalisation de plusieurs TLR (Watanabe et al., 2008). En effet, des études *in vitro* ont mis en évidence que la préstimulation avec du MDP réduisait les productions cytokiniques de DC stimulées par les agonistes des TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 et TLR9. Ces effets inhibiteurs de NOD2 sont associés à une augmentation de l'activité du régulateur négatif des TLR IRF4 (Interferon regulatory factor 4). Le fait que NOD2 soit également capable d'augmenter les productions d'IL-8, de TNF et d'IL-1 $\beta$ , généralement en coopérant avec les TLR (Netea et al., 2005; Uehara et al., 2005), suggère que, selon les circonstances, NOD2 peut affecter positivement

ou négativement les réponses cytokiniques induites après activation des TLR. De plus, l'activation de NOD2 permet également de mettre en place une réponse immunitaire adaptative de type Th2 caractérisée par la production d'IL-4 et d'IL-5 *in vivo* (Magalhaes et al., 2008). Une mutation de NOD2 empêcherait ainsi la mise en place de cette réponse Th2 et favoriserait une réponse Th1 exacerbée entraînant une inflammation de la muqueuse intestinale.



**Figure 17 : Reconnaissance du peptidoglycane par NOD2 : dualité de fonction dans l'inflammation.**

Selon les situations, la reconnaissance des produits de dégradation du peptidoglycane par NOD2 peut aboutir à la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire ou à une réponse anti-inflammatoire. Inspiré de *Strober W et al, Nature Reviews Immunology 2006*.

# **OBJECTIFS**

## Objectifs de la thèse

L'utilisation de bactéries lactiques probiotiques comme outil d'immuno-intervention semble être une alternative intéressante dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Cependant les effets bénéfiques de ces bactéries sont spécifiques de la souche utilisée et les mécanismes d'action de ces micro-organismes restent encore méconnus. De nombreux travaux ont montré que les bactéries lactiques présentent des propriétés immuno-modulatrices diverses et souche-spécifiques *in vitro* corrélées à des capacités anti-inflammatoires *in vivo* dans des modèles de colites murines expérimentales mimant la pathologie humaine (Foligne et al., 2007a). Dans un modèle de colite induite au TNBS, il a été montré au laboratoire que les effets protecteurs des lactobacilles pouvaient être obtenus après administration des bactéries par voie orale ou intrapéritonéale (Foligne et al., 2005), suggérant un effet à distance via la migration de populations cellulaires régulatrices. Il a ensuite été mis en évidence que certains lactobacilles n'induisent qu'une maturation partielle des cellules dendritiques et que le transfert adoptif de ces cellules à profil régulateur est capable de protéger les souris de la colite expérimentale de façon NOD2- et TLR2-dépendante (Foligne et al., 2007b).

Le but de ce travail de thèse a été de caractériser les acteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans les capacités immunorégulatrices des bactéries lactiques. Notre premier objectif a été de déterminer si le peptidoglycane, constituant de la paroi bactérienne dont les produits de dégradation sont reconnus par NOD2, était un composant actif impliqué dans les capacités immunorégulatrices des bactéries lactiques. Après avoir démontré que du peptidoglycane purifié de la souche anti-inflammatoire *Lactobacillus salivarius* Ls33 (en collaboration avec l'équipe du Dr Corinna Hermann) protège les souris de la colite induite au TNBS, nous avons ensuite caractérisé les populations cellulaires responsables de l'effet immunorégulateur de cette molécule. Puisque les bactéries lactiques présentent des effets anti-inflammatoires souche-spécifiques, notre deuxième objectif a été de comparer les effets du peptidoglycane de Ls33 à celui d'une souche ne présentant pas de capacités anti-inflammatoires, *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Ayant mis en évidence que les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane dépendent des capacités immunorégulatrices de la souche à partir de laquelle il est purifié, notre troisième objectif a été d'identifier le(s) composant(s) responsable(s) des différences observées entre les deux peptidoglycanes. Cette partie du travail, réalisée en collaboration avec le Dr Ivo Boneca, a consisté en une analyse structurale des deux peptidoglycanes puis à l'évaluation des capacités protectrices d'un muropeptide libéré exclusivement par Ls33 dans le modèle de colite induite au TNBS. Nous avons également déterminé l'implication des voies de signalisation NOD2 et TLR dans les capacités anti-inflammatoires du muropeptide.

Cette étude a fait l'objet d'un article accepté pour publication dans Gut.

# RÉSULTATS

## Manuscrit

### **Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide**

Elise Macho Fernandez, Véronique Valenti, Christoph Rockel, Corinna Hermann, Bruno Pot, Ivo Gomperts Boneca and Corinne Grangette

*Gut.* 2011 April 6. [Epub ahead of print]

D'étiologie inconnue, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, telles que la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, semblent résulter d'une réaction immunitaire inappropriée vis-à-vis du microbiote intestinal chez des individus génétiquement prédisposés. De ce fait, la modulation du microbiote par des probiotiques afin de prévenir ou de réduire l'inflammation intestinale représente une alternative thérapeutique intéressante dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Des études cliniques ont rapporté les effets de certains probiotiques chez des patients souffrant de pouchite ou de rectocolite hémorragique (Bibiloni et al., 2005; Kruis et al., 2004; Zocco et al., 2006). Cependant, les effets thérapeutiques des bactéries probiotiques se sont avérés spécifiques de la souche utilisée et de nombreuses bactéries lactiques pourtant bien caractérisées se sont montrées inefficaces, en particulier chez les patients atteints de maladie de Crohn (Marteau et al., 2006). Afin d'optimiser l'utilisation des bactéries lactiques en thérapeutique et d'expliquer leur spécificité de souche, il est nécessaire de comprendre le mode d'action de ces micro-organismes.

Dans un modèle murin de colite expérimentale induite au TNBS, nous avons observé que les capacités protectrices de la souche anti-inflammatoire *Lactobacillus salivarius* Ls33 sont corrélées à la production locale d'IL-10 et nécessitent la présence du récepteur NOD2. Puisque NOD2 reconnaît les produits de dégradation du peptidoglycane (Girardin et al., 2003b), nous avons préparé du peptidoglycane hautement purifié de la souche Ls33 et montré que l'administration intrapéritonéale de ce composant protège les souris de la colite expérimentale. L'effet protecteur du peptidoglycane de Ls33 implique la voie de signalisation de l'IL-10, la voie immuno-suppressive de l'indoléamine 2,3-dioxygénase et le développement, au sein des ganglions mésentériques, de cellules dendritiques (DC) régulatrices CD103<sup>+</sup> et de cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Nous avons également mis en évidence que les effets protecteurs du peptidoglycane de Ls33 peuvent être obtenus après administration orale du composant. Nous avons montré que le peptidoglycane de Ls33 favorise, *in vitro*, la différenciation de DC naïves en DC partiellement matures productrices d'IL-10 et que le transfert adoptif de ces DC est capable de protéger les souris de la colite.

En utilisant des DC dérivées de souris *Nod2*<sup>-/-</sup>, nous avons montré que l'effet protecteur dépend de cette voie de signalisation. Les capacités protectrices n'ayant pas été obtenues avec le peptidoglycane de la souche non anti-inflammatoire *L. acidophilus* NCFM, nous avons réalisé une analyse structurale des deux peptidoglycanes. Nous avons ainsi identifié un ligand NOD2, le muuropeptide M-tri-Lys, uniquement produit par Ls33, alors que les deux souches arborent le muuropeptide M-tri-Lys-D-Asn. L'administration du M-tri-Lys synthétique par voie systémique protège les souris de la colite de façon NOD2-dépendante mais ne nécessite pas la présence de l'adaptateur MyD88. Le peptidoglycane des deux souches activant NOD2, nous avons ensuite comparé les effets du M-tri-Lys et du M-tri-Lys-D-Asn. Bien que ces deux muuropeptides activent NOD2 *in vitro*, seul le M-tri-Lys est capable de protéger les souris de la colite expérimentale.

En conclusion, nos résultats indiquent que le peptidoglycane et certains de ses dérivés sont des composants actifs dans la fonctionnalité des lactobacilles probiotiques et représentent une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

## Supplementary materials and methods

### Preparation of highly purified peptidoglycan

Peptidoglycan was purified from Ls33 and NCFM strains, according to Travassos *et al.* (Travassos *et al.*, 2004) Briefly, bacteria were grown in 10-liters MRS culture and were harvested after centrifugation at 4°C. Five to 10 gram (dry weight) of bacteria were resuspended in ice cold pyrogen-free water, added to 8% boiling Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) and boiled for 30 minutes. After cooling down, the solution was centrifuged for 20 minutes at 100,000 x g and the pellet was washed with pyrogen-free water until no SDS could be detected according to the method of Hayashi *et al.* (Hayashi *et al.*, 1973) Bacterial samples were then physically disrupted with acid-washed glass beads (100 µm, Sigma Aldrich) and peptidoglycan was recovered using differential centrifugation (5 min at 2300 rpm). The pellet was successively digested with 1 mg/ml α-amylase for 2 h at 37°C, 1 mg/ml DNase I, 1 mg/ml RNase A and 1 mg/ml lipase in 25 ml MgCl<sub>2</sub> solution (200 mM) for 2 h at 37°C and with 100 µg/ml trypsin in 10 mM CaCl<sub>2</sub> for 18 h at 37°C. Samples were washed with pyrogen-free water and boiled in 2% SDS. After SDS removal, the resulting pellet (containing approximately 250 to 500 mg of peptidoglycan) was treated with 40-49% hydrofluoric acid for 48-72 h at 4°C. Finally, peptidoglycan was washed with 8 M LiCl, 0.1 M EDTA and acetone and finally with pyrogen-free water before lyophilization and storage at – 20°C.

The quality of the purified peptidoglycan was verified by measuring i) the capacity of different fractions along the purification step to induce the production of TNFα on bone marrow (BM) cells (0.5 x 10<sup>6</sup> cells/ml) derived from wild type (WT) and TLR2-deficient (*Tlr2*<sup>-/-</sup>) mice or ii) the capacity of the final fraction corresponding to highly purified peptidoglycans to activate TLR2 using HEK293 transfected cell lines. Briefly, BM cells were incubated for 24 h with the different peptidoglycan fractions (1 µg/ml). When assessing the production of murine TNFα by ELISA, it was found that the crude fractions induced large amount of TNFα on WT BM cells as compared to *Tlr2*<sup>-/-</sup> BM cells, while the highly purified fraction could no longer induce the production of this cytokine (see supplementary figure 1A). WT and murine TLR2-expressing (stably transfected 293/mTLR2, Invivogen) HEK293 cell lines were co-transfected with 270 ng of the NF-κB-inducible luciferase reporter plasmid (pNiFty2-Luc, InvivoGen) and 27 ng of the renilla luciferase reporter plasmid (pRL-TK, Promega) as an internal control using FuGENE<sup>®</sup> 6 Transfection kit (Roche). Cells were stimulated 24 h later with 1 µg/ml of PGN, LTA or M-Tri-Lys. NF-κB-dependent luciferase activation was measured following subsequent 24 h of co-incubation using the dual-luciferase reporter assay (Promega) and normalized according to the renilla luciferase activity. Results indicated that purified

peptidoglycan was no longer contaminated with TLR2 ligand contaminant such as LTA (see supplementary figure 1B).

### **HPLC analysis of highly purified peptidoglycans**

Purified peptidoglycan was digested with mutanolysin (Sigma) in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 5.5 for 19 h at 37°C under rotational shaking. The enzyme was inactivated by boiling the sample for 3 min and insoluble material was removed by centrifugation. Digested samples were reduced in a 0.25 M borate buffer pH 9 by addition of sodium borohydride (Sigma). The reaction was stopped by addition of orthophosphoric acid to a final pH of 2. Reduced muropeptides were analyzed by HPLC on a Hypersil ODS18 reverse phase column (250 by 4.6 mm, 3 µm particle size) with a methanol gradient from 0 to 30% in ammonium phosphate buffer pH 5.6. Chromatograms were obtained by monitoring at 206 nm. Each peak was collected and desalted on the same HPLC column using an acetonitrile (ACN) gradient from 0 to 25% in 0.05% trifluoroacetic acid (TFA). Desalted muropeptides were analyzed by MALDI (Applied Biosystems Inc) using  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (4-CHCA) as MALDI matrix after a second desalting of the samples directly on the sample plate. Briefly, muropeptides were dissolved in 1 µl of ACN/H<sub>2</sub>O/TFA (70:30:0.1%). 0.5 µl of sample and 0.5 µl of a six fold dilution of 4-CHCA were loaded on the MALDI sample plate. Samples were air-dried at room temperature and washed for 30 s with 0.7 µl of cold water (0.1% TFA). After removing the liquid with a pipette, samples were recrystallized with 0.5 µl of ACN/H<sub>2</sub>O/TFA (70:30:0.1%).

### **Colitis parameters evaluation**

Mice were weighted daily and sacrificed 48-72 h after colitis induction. Macroscopic inflammation of the colon was performed blindly using the Wallace scoring method. (Wallace et al., 1989) Histological analysis was carried out on May-Grünwald Giemsa stained 7 µm tissue sections from colon samples fixed in 4% formalin, embedded in paraffin and blindly scored according to the Ameho criteria. (Ameho et al., 1997) Polymorphonuclear neutrophil infiltration in the distal colon was estimated by quantifying the myeloperoxidase (MPO) activity as previously described. (Foligne et al., 2007b)

For quantitative real time-PCR, individual colon samples were stored in RNA later (Ambion) at -20°C until RNA extraction using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel). cDNA was synthesised from 1 µg of total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, USA) and random hexamers (Amersham). qRT-PCR reaction were performed in the Applied Biosystems 7300 real time PCR system using primers and probes as described in ref. 5. Relative mRNA levels ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) were determined by comparing 1) the PCR cycle thresholds

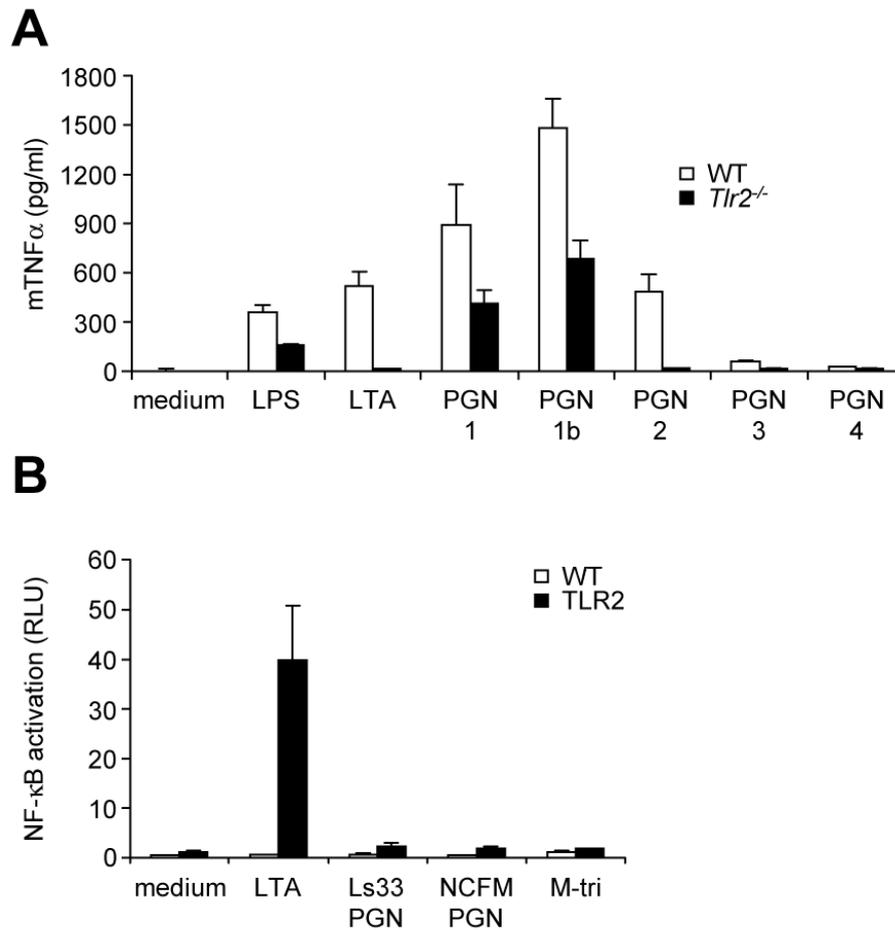
(Ct) for the gene of interest and the housekeeping gene *Actb* ( $\Delta$ Ct) and 2)  $\Delta$ Ct values for treated and untreated animal groups ( $\Delta\Delta$ Ct).

To quantify colonic cytokine and chemokine levels, fragments of distal colon were homogenized in Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce, USA) supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche) and stored at -80°C until ELISA analysis.

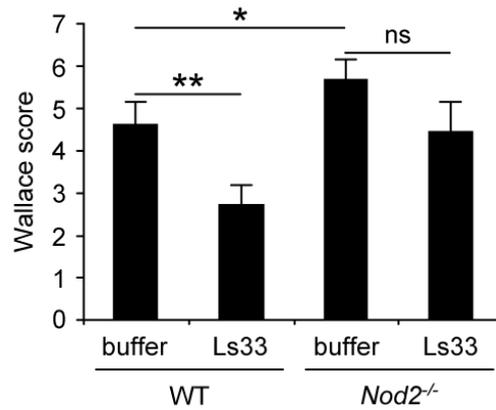
## SUPPLEMENTARY REFERENCES

- 1 **Travassos LH**, Girardin SE, Philpott DJ, *et al.* Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 2004;**5**:1000-6.
- 2 **Hayashi H**, Araki Y, Ito E. Occurrence of glucosamine residues with free amino groups in cell wall peptidoglycan from bacilli as a factor responsible for resistance to lysozyme. *J Bacteriol* 1973;**113**:592-8.
- 3 **Wallace JL**, MacNaughton WK, Morris GP, *et al.* Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;**96**:29-36.
- 4 **Ameho CK**, Adjei AA, Harrison EK, *et al.* Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* 1997;**41**:487-93.
- 5 **Foligne B**, Zoumpopoulou G, Dewulf J, *et al.* A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS ONE* 2007;**2**:e313.

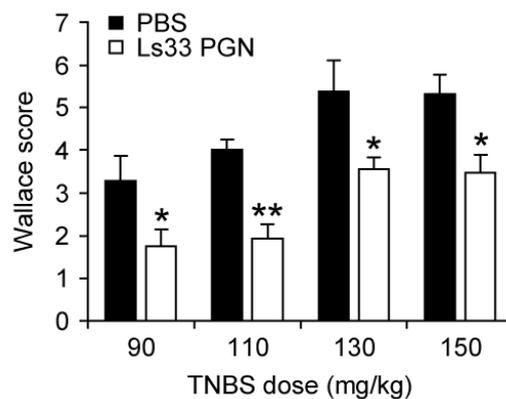
## Supplementary figures



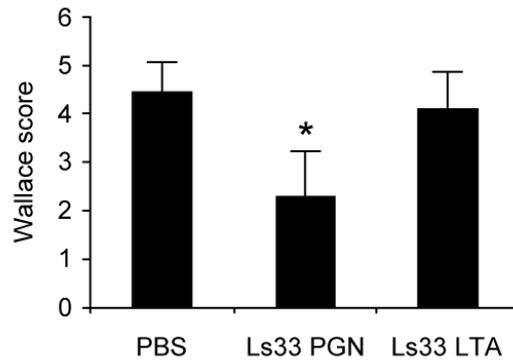
**Figure S1. Verification of the purity of Ls33 PGN.** (A) Murine TNF $\alpha$  levels determined in culture supernatants of murine bone marrow (BM) cells from wild type (WT) and *Tlr2*-deficient (*Tlr2*<sup>-/-</sup>) C57BL/6 mice stimulated for 24 h with LPS (10 ng/ml), *S. aureus* LTA (10  $\mu$ g/ml) or with different Ls33 peptidoglycan fraction (1  $\mu$ g/ml) obtained at the sequential purification step: peptidoglycan 1 (1st SDS boiling after removal of SDS), peptidoglycan 1b (post physical disruption with glass beads), peptidoglycane 2 (post enzyme treatment), peptidoglycan 3 (post second SDS boiling), peptidoglycan 4 (post hydrofluoric acid treatment: final material). Data represent the mean with SEM of four independent experiments. (B) WT and murine TLR2-expressing HEK293 cell lines transfected with the NF- $\kappa$ B-inducible luciferase reporter plasmid were stimulated with 1  $\mu$ g/ml *S. aureus* LTA, Ls33 PGN, NCFM peptidoglycan and M-tri-Lys mucopeptide for 24 h before the quantification of the NF- $\kappa$ B-dependent luciferase activation. Data represent mean values of triplicate cultures with SD. The results are expressed in relative luminescence units normalized with the renilla luciferase activity and indicated that the purified peptidoglycan was no longer contaminated with TLR2 ligand contaminant such as LTA, as previously described (Travassos et al., 2004).



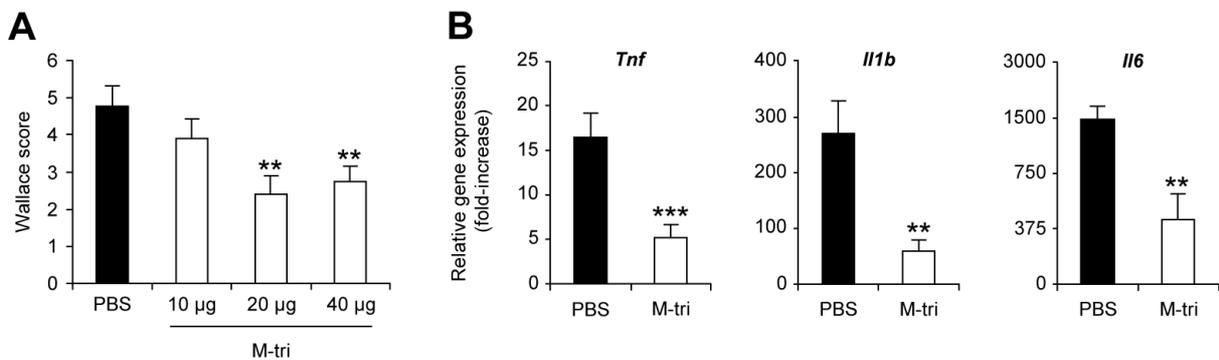
**Figure S2. The protective effect of *L. salivarius* Ls33 against TNBS-induced colitis is NOD2-dependent.** WT or *Nod2*-deficient (*Nod2*<sup>-/-</sup>) C57BL/6 mice were fed for five consecutive days with either carbonate buffer (buffer) or  $2 \times 10^8$  live *L. salivarius* Ls33 (Ls33) prior administration of TNBS (procedure 2). The Wallace score was assessed three days later. Data represent mean values of 9 animals. Error bars represent SEM (ns, not significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  vs. buffer-treated WT or *Nod2*<sup>-/-</sup> mice).



**Figure S3. Ls33 peptidoglycan rescues mice from mild and severe colitis.** BALB/c mice (n=7-9) were injected i.p. with PBS or 100  $\mu$ g Ls33 peptidoglycan concomitantly with TNBS instillation at different doses (90 mg/kg, 110 mg/kg, 135 mg/kg and 150 mg/kg). The Wallace score was assessed two days later. Data represent mean values with SEM (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )



**Figure S4. The protective effect of Ls33 peptidoglycan is not linked to LTA contamination.** BALB/c mice were injected i.p. with PBS, 100  $\mu$ g Ls33 peptidoglycan or 100  $\mu$ g Ls33 LTA concomitantly with TNBS instillation. The Wallace score was assessed two days later. Data represent mean values of 6-9 animals with SEM (\*,  $P < 0.05$  vs. PBS-treated mice).



**Figure S5. The protective effect of M-tri-Lys is dose-dependent and is associated with a decrease of pro-inflammatory gene expression in the colon.** BALB/c mice ( $n=6-10$ ) were injected i.p. with PBS or different doses of synthetic M-tri (10  $\mu$ g, 20  $\mu$ g or 40  $\mu$ g) concomitantly with TNBS instillation (110 mg/kg). Parameters were assessed two days after induction of colitis. Data represent mean values with SEM (\*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. PBS-treated mice). (A) Wallace score. (B) Pro-inflammatory gene expression in colonic samples of PBS- or 20  $\mu$ g M-tri-treated mice. Values are expressed as the relative mRNA levels compared with healthy colons.

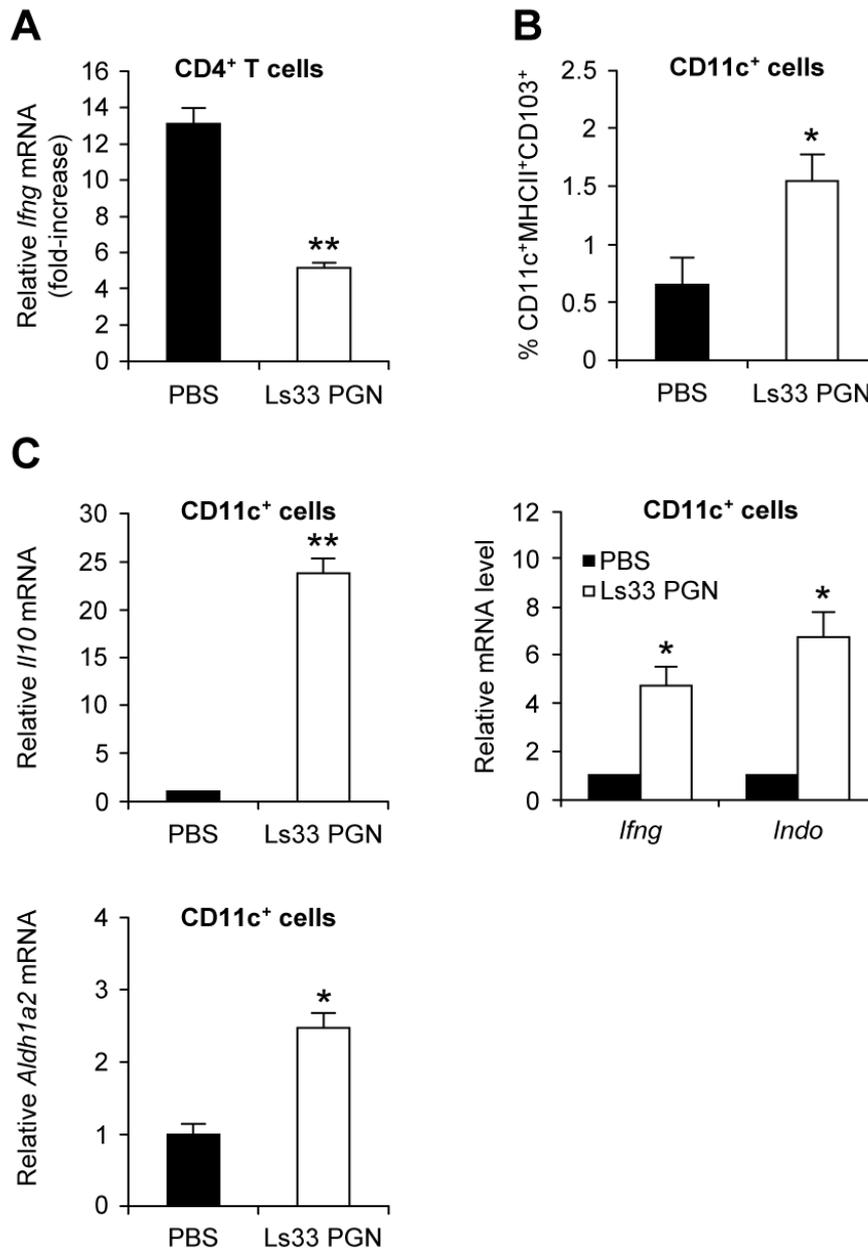
## Résultats complémentaires

Nos résultats indiquent que les capacités anti-inflammatoires spécifiques de souche des lactobacilles sont corrélées à la reconnaissance, par NOD2, d'un mucopeptide libéré par le peptidoglycane.

Des études complémentaires ont été réalisées afin de poursuivre la caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane de Ls33. Ces travaux ont eu pour but (1) de caractériser les populations cellulaires responsables de l'effet anti-inflammatoire du peptidoglycane de Ls33 au sein la *lamina propria* intestinale, (2) d'étudier les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane de Ls33 dans un modèle de colite expérimentale plus proche de la pathologie humaine (colite chronique induite au TNBS) et (3) d'identifier des voies de signalisation impliquées dans les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane de Ls33.

### **1. L'effet protecteur du peptidoglycane de Ls33 est associé à une diminution de la réponse Th1 et à un recrutement de DC régulatrices au sein de la *lamina propria* intestinale.**

Dans le but de poursuivre la caractérisation des populations cellulaires impliquées dans l'effet protecteur du peptidoglycane de Ls33, nous avons isolé les cellules mononucléées de la *lamina propria* 48 h après le déclenchement de la colite. Comparativement à une souris saine, l'administration de TNBS favorise le développement de cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant fortement le gène *Ifng* (Figure 1A). Les souris traitées avec le peptidoglycane de Ls33 présentent une diminution de l'expression de ce gène. Tout comme nous l'avons observé au niveau des MLN (Macho Fernandez et al., 2011), l'administration du peptidoglycane de Ls33 favorise un recrutement de cellules dendritiques régulatrices au sein de la *lamina propria* comme l'indiquent l'augmentation du nombre de cellules CD11c<sup>+</sup>CMHII<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> (Figure 1B) et l'augmentation de l'expression, chez les cellules CD11c<sup>+</sup>, des gènes codant pour l'IL-10, les médiateurs de la voie immunosuppressive de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (*Indo* et *Ifng*) et une aldéhyde déhydrogénase impliquée dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque (*Aldh1a2*) (Figure 1C).

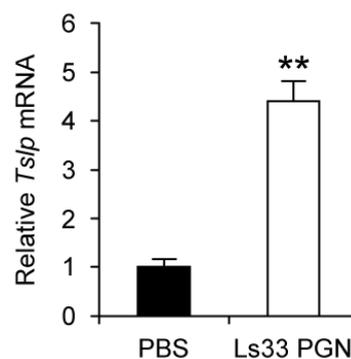


**Figure 1 : Les capacités protectrices du peptidoglycane de Ls33 sont corrélées à une diminution de la réponse Th1 et à un recrutement de DC régulatrices au sein de la lamina propria.**

Des souris BALB/c (n=10-12) ont reçu une injection intrapéritonéale de PBS ou de peptidoglycane de Ls33 (100 µg) juste avant l'administration intrarectale du TNBS. Les cellules CD4<sup>+</sup> et CD11c<sup>+</sup> ont été purifiées de la lamina propria deux jours plus tard. (A) Expression génique de l'IFNγ dans les cellules CD4<sup>+</sup>. Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart à la moyenne de l'expression relative des ARNm des souris traitées par rapport à l'expression relative des ARNm de cellules de souris saines (\*\*, p<0.01). (B) Pourcentage de cellules CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> (\*, p<0.05 vs. souris traitées avec du PBS). (C) Taux des ARNm des gènes *Il10*, *Ifng*, *Indo* et *Aldh1a2* chez les cellules CD11c<sup>+</sup>. Les valeurs représentent le taux relatifs des ARNm ± l'écart à la moyenne comparativement aux souris traitées avec du PBS (\*, p<0.05 ; \*\*, p<0.01).

## 2. L'effet protecteur du peptidoglycane de Ls33 est corrélé à une augmentation de l'expression de la TSLP au niveau du côlon.

Puisque les capacités tolérogènes des DC semblent dépendre du microenvironnement local, nous avons ensuite évalué, dans le modèle de colite aiguë induite par le TNBS, l'expression du gène codant pour la TSLP (thymic stromal lymphopoietin), un médiateur produit par les cellules épithéliales favorisant la différenciation de DC régulatrices (Rimoldi et al., 2005). Comparativement au groupe de souris ayant reçu une injection de PBS, les souris traitées avec le peptidoglycane de Ls33 présentent augmentation de l'expression de la TSLP au niveau du côlon (Figure 2), suggérant que l'administration du composant stimule la production de cette molécule immunorégulatrice.

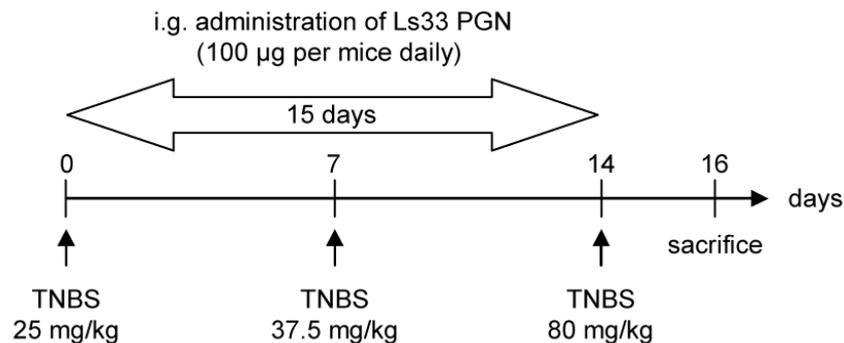


**Figure 2 : Les capacités protectrices du peptidoglycane de Ls33 sont corrélées à une augmentation de l'expression de la TSLP au niveau du côlon.**

Des souris BALB/c (n=4) ont reçu une injection intrapéritonéale de PBS ou de peptidoglycane de Ls33 (100 µg) juste avant l'administration intrarectale du TNBS. L'expression du gène codant pour la TSLP a été évaluée dans les côlons 2 jours après le déclenchement de la colite. Les valeurs représentent le taux relatifs des ARNm  $\pm$  l'écart à la moyenne comparativement aux souris traitées avec du PBS (\*\*,  $p < 0.01$ ).

### 3. L'administration de peptidoglycane de Ls33 protège les souris d'une colite chronique.

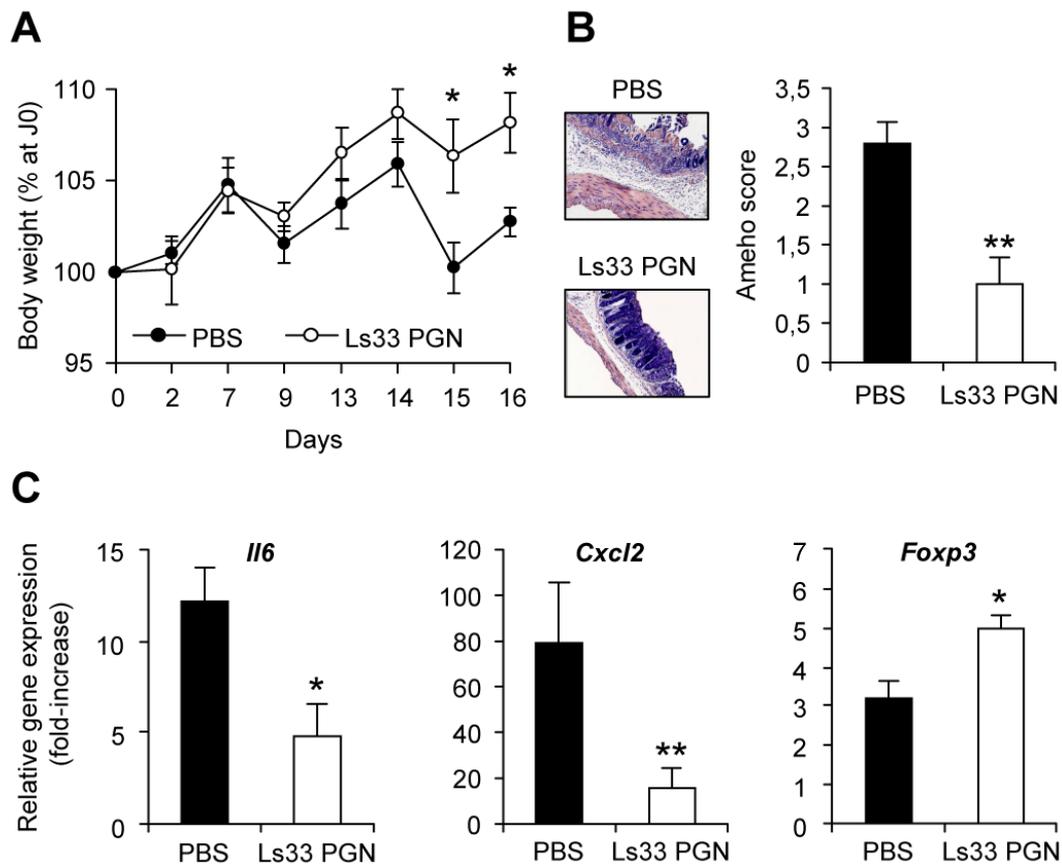
Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin étant caractérisées par des poussées inflammatoires entrecoupées de périodes de rémission, nous avons testé l'effet anti-inflammatoire du peptidoglycane de Ls33 dans un modèle de colite chronique comprenant 3 instillations de TNBS (voir le schéma du protocole, Figure 3).



**Figure 3 : Protocole du modèle de colite chronique.** Des souris BALB/c (n=5-8) reçoivent à trois reprises une dose de TNBS (25 mg/kg, 37,5 mg/kg et 80 mg/kg). De la première à la troisième administration de TNBS, 100 µg de peptidoglycane de Ls33 est administré chaque jour par voie orale aux souris. Les souris sont sacrifiées 48 h après la 3<sup>ème</sup> administration de TNBS.

Contrairement au modèle de colite aiguë induit par l'administration intrarectale d'une seule dose de TNBS, ce modèle de colite chronique conduit à une inflammation plus modérée non quantifiable macroscopiquement par l'échelle de Wallace. Nous avons néanmoins pu évaluer d'autres paramètres comme la perte de poids, le score histologique d'inflammation et l'expression de différents gènes pro-inflammatoires au niveau du côlon.

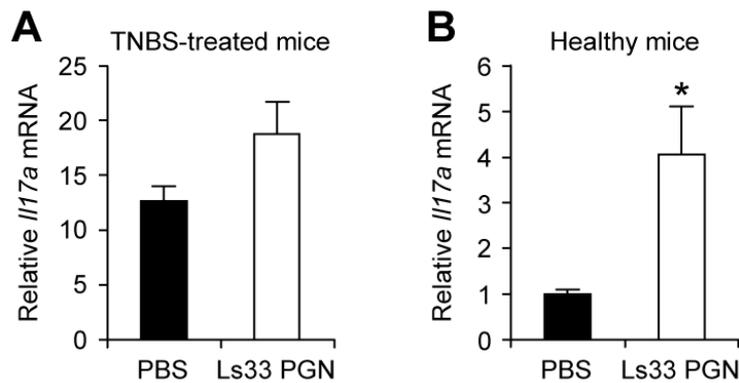
Comparativement au groupe de souris traitées avec du PBS, l'administration journalière de 100 µg de peptidoglycane de Ls33 pendant 15 jours réduit significativement la perte de poids lors de la dernière administration de TNBS (Figure 4A). L'examen histologique du côlon distal des souris traitées avec du PBS montre une destruction de l'architecture et une nécrose de l'épithélium, un épaississement de la sous-muqueuse ainsi qu'une infiltration de cellules mononucléées, principalement des neutrophiles. L'administration du peptidoglycane de Ls33 diminue ces dommages histologiques (Figure 4B) et réduit l'expression de gènes pro-inflammatoires au sein de la muqueuse colique (Figure 4C). De plus, les souris traitées avec le peptidoglycane de Ls33 présentent une augmentation de l'expression du gène immunorégulateur *Foxp3* au niveau du côlon (Figure 4C). En conclusion, l'administration du peptidoglycane de Ls33 atténue une colite chronique induite au TNBS.



**Figure 4 : L'administration orale du peptidoglycane de Ls33 atténue une colite chronique induite par l'administration de TNBS.**

Des souris BALB/c ont été traitées comme décrit dans le protocole de la figure 3. Les valeurs représentent la moyenne de 5-8 souris  $\pm$  l'écart standard à la moyenne (\*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$ ). (A) Evolution du poids des souris durant l'expérimentation. (B) Analyse histologique de coupes de côlon représentatives de souris traitées avec du PBS ou du peptidoglycane de Ls33 colorées au May Grünwald Giemsa (grossissement x20). (C) Expression génique de molécules pro-inflammatoires et régulatrices dans les échantillons de colons prélevés à J16.

Nous avons également étudié la réponse Th17 dans ce modèle. L'administration chronique de TNBS favorise le développement d'une réponse Th17 au niveau du côlon comme l'indique l'augmentation de l'expression du gène de l'*Il17a* qui n'est pas modulée par l'administration du peptidoglycane de Ls33 (Figure 5A). Cependant, nous avons observé que le gavage de souris saines avec du peptidoglycane de Ls33 pendant 15 jours provoque une augmentation de l'expression du gène *Il17a* dans le côlon (Figure 5B).

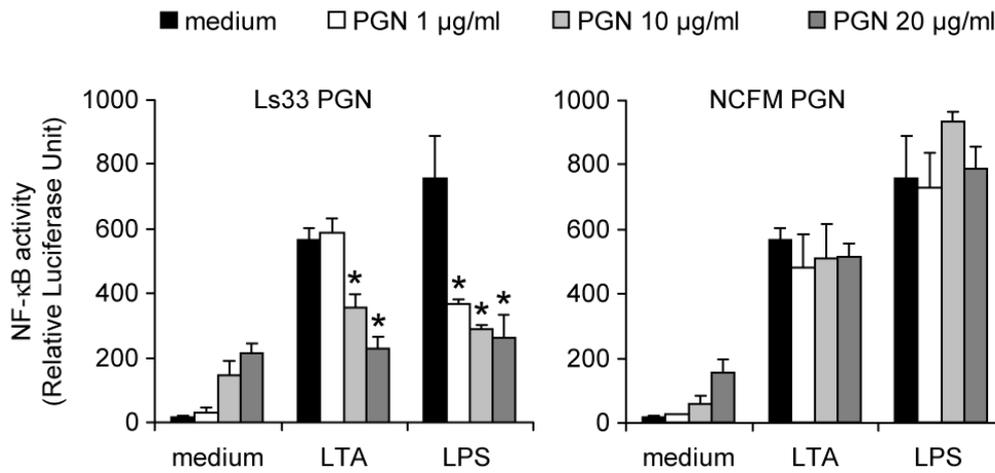


**Figure 5 : Effets de l'administration du peptidoglycane de Ls33 sur l'expression de l'IL-17A au niveau du côlon.**

Des souris BALB/c (n=5-8) reçoivent (A) ou non (B) à trois reprises une dose de TNBS (25 mg/kg, 37,5 mg/kg et 80 mg/kg). De la première à la troisième administration de TNBS, 100 µg de peptidoglycane de Ls33 est administré chaque jour par voie orale aux souris. Les souris sont sacrifiées 48 h après la 3<sup>ème</sup> administration de TNBS et l'expression du gène codant l'IL-17A est évalué dans les côlons des souris. Les résultats représentent la moyenne de 5-8 souris ± l'écart standard à la moyenne (\*, p<0.05).

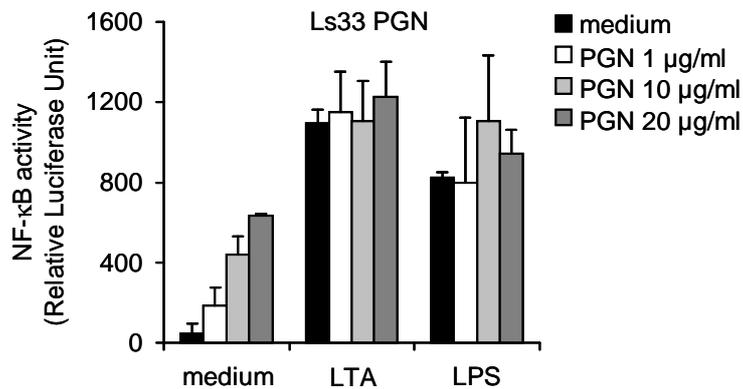
### **3. Le peptidoglycane de la souche anti-inflammatoire Ls33 inhibe l'activation de la voie NF-κB induite par les TLR2 et TLR4.**

Puisque l'inflammation est souvent associée à une augmentation incontrôlée de la voie NF-κB, nous avons évalué la capacité du peptidoglycane de Ls33 et de NCFM à inhiber l'activation de cette voie de signalisation en utilisant des BMDC de souris transgéniques présentant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de NF-κB. De façon attendue, la stimulation des BMDC par les agonistes des TLR2 (LTA) et TLR4 (LPS) active fortement la voie NF-κB. Au contraire, la stimulation avec des doses croissantes de peptidoglycane de lactobacille induit une activation dose-dépendante mais limitée de cette voie de signalisation. De façon intéressante, seul le prétraitement des BMDC avec le peptidoglycane de Ls33 réduit de façon dose-dépendante (jusqu'à 60% d'inhibition) l'activité de NF-κB induite par les deux agonistes TLR. Cet effet inhibiteur n'est pas retrouvé lorsque les BMDC sont prétraitées avec le peptidoglycane de la NCFM (Figure 6) ou lorsque les cellules sont prétraitées avec le peptidoglycane pendant une courte période (2 h) (Figure 7). Ces résultats suggèrent qu'un des mécanismes de l'effet anti-inflammatoire du peptidoglycane de Ls33 est de favoriser la mise en place d'un phénomène de tolérance en inhibant l'activation de la voie NF-κB.



**Figure 6 : Seul le peptidoglycane de *L. salivarius* Ls33 inhibe l'activation de la voie NF-κB induite par les agonistes des TLR2 et TLR4.**

Des BMDC dérivées de souris transgéniques 3x-κB-luc ont été préincubées ou non (medium) avec des doses croissantes (1, 10 or 20 µg/ml) de peptidoglycane pendant 24 h puis stimulées pendant 6 h avec des LTA (10 µg/ml) ou du LPS (100 ng/ml). L'activation de NF-κB a été déterminée par la quantification de l'activité luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs représentent la moyenne de triplicats de culture ± la déviation standard (\*, p<0.05).

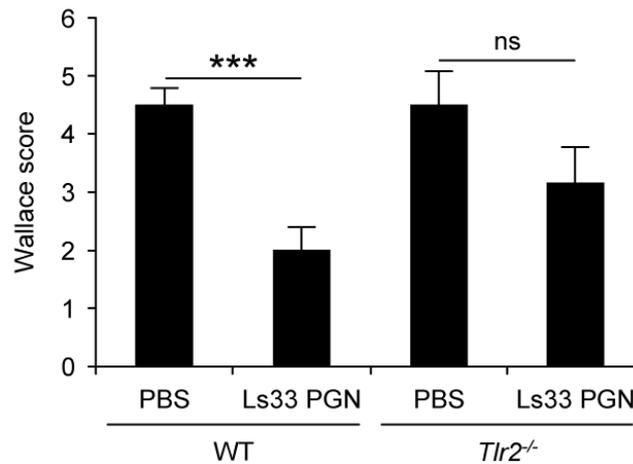


**Figure 7 : Un court prétraitement par le peptidoglycane de Ls33 n'inhibe pas l'activation de NF-κB induite par les TLR.**

L'activation de NF-κB a été déterminée en quantifiant l'activité luciférase dans les lysats cellulaires des BMDC dérivées de souris transgéniques 3x-κB-luc prétraitées ou non (medium) pendant 2 h avec concentrations croissantes de peptidoglycane de Ls33 (1, 10 or 20 µg/ml) puis stimulées pendant 6 h avec des LTA (10 µg/ml) ou du LPS (100 ng/ml). Les valeurs représentent la moyenne de triplicats de culture ± la déviation standard.

#### 4. L'effet protecteur du peptidoglycane de Ls33 nécessite la présence du TLR2.

Afin de déterminer le rôle du TLR2 dans les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane de Ls33, nous avons évalué les effets protecteurs du composant dans le modèle de colite aiguë réalisé chez des souris WT ou déficientes pour le TLR2. Chez les souris WT, l'administration intrapéritonéale du peptidoglycane de Ls33 protège les souris de la colite alors que le récepteur TLR2 contribue partiellement aux effets protecteurs du peptidoglycane de Ls33 (Figure 8).



**Figure 8 : Les effets protecteurs du peptidoglycane de Ls33 nécessitent la présence du TLR2.** Des souris C57BL/6 WT ou *Tlr2*<sup>-/-</sup> (n=7-10) ont reçu une injection intrapéritonéale de PBS ou de peptidoglycane de Ls33 (100 µg) juste avant l'instillation intrarectale du TNBS. Le score macroscopique d'inflammation de Wallace a été évalué 3 jours plus tard. Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart standard à la moyenne. (ns, not significant ; \*\*\*, p<0.001)

## **Matériel et méthodes des résultats complémentaires**

### **Souris**

Les souris BALB/c et C57BL/6 WT (5-7 semaines) proviennent de chez Charles River. Les expériences sur les souris TLR2 KO (6 semaines) ont été réalisées à l'Institut Pasteur à Paris, en collaboration avec le Dr Ivo Boneca. Les souris transgéniques (C57BL/6J x CBA/J)F1 présentant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur contenant des sites NF- $\kappa$ B pour la chaîne Ig $\kappa$ L et la firefly luciférase (*3x- $\kappa$ B-luc*) (Didierlaurent et al., 2004) ont été généreusement fournies par le Dr Jean-Claude Sirard (U1019-UMR8204, CIIL, équipe 8, Lille France).

### **Purification des cellules mononucléées de la *lamina propria* intestinale**

Les cellules de *lamina propria* ont été obtenues à partir de côlons prélevés 48 h après l'administration de TNBS. Les côlons sont nettoyés dans du PBS 1X froid, coupés en morceaux de 1 cm et incubés dans du HBSS sans Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup> supplémenté de 5 mM EDTA et de 4% de SVF pendant 20 minutes à 37°C sous agitation lente. Les morceaux de côlons résiduels sont ensuite digérés deux fois dans du PBS 1X supplémenté de 0.1 g de collagénase D, de 50 U/ml de DNase I et de 4% de SVF (pour 100 ml) pendant 20 minutes à 37°C sous agitation lente. Les cellules obtenues sont reprises dans une solution de Percoll 40% puis déposées sur une solution de Percoll 80%. Après centrifugation, l'anneau situé à l'interface des deux gradients de Percoll, qui contient les cellules mononucléées, est récupéré. Les cellules CD4<sup>+</sup> et CD11c<sup>+</sup> de la *lamina propria* ont ensuite été purifiées et analysées par cytométrie ou PCR en temps réel comme décrit précédemment (Macho Fernandez et al, 2011).

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

Les cellules dendritiques sont différenciées à partir de cellules souches de moelle osseuse isolées des fémurs et tibias de souris. Après la lyse des globules rouges, les cellules sont cultivées en boîte de Petri, non traitées pour la culture cellulaire, à raison de 2,5 x 10<sup>6</sup> cellules dans 10 ml de milieu Iscove (Sigma Aldrich) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco-BRL), de 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoéthanol, d'1 mM de glutamine, de 50  $\mu$ g/ml de gentamycine et de 10% de surnageant de culture d'une lignée cellulaire produisant le Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (lignée cellulaire J588 transfectée avec le gène codant pour le GM-CSF). Les cellules sont utilisées après 10 jours de différenciation.

### Test d'activation de NF- $\kappa$ B

Les BMDC dérivées de souris 3 $\times$ - $\kappa$ B-*luc* ont été préincubées pendant 2 h ou 24 h avec des doses croissantes de peptidoglycane de Ls33 ou de NCFM (1, 10 ou 20  $\mu$ g/ml) avant d'être ou non stimulées pendant 6 h avec des LTA de *S. aureus* à 10  $\mu$ g/ml (Invivogen, San Diego, CA, USA) ou du LPS (*E. coli* serotype 0111:B, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) à 100 ng/ml. L'activité luciférase a été estimée dans les lysats cellulaires en utilisant le Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA).

### Modèle de colite chronique induite au TNBS

Un modèle de colite chronique induite par l'administration de doses croissantes de TNBS à une semaine d'intervalle a été mis en place chez des souris BALB/c. Chaque semaine les souris sont anesthésiées et reçoivent une administration intra-rectale de 50  $\mu$ l d'une solution de TNBS (Sigma-Aldrich Chemical, Saint Louis, MO, USA) dissous dans 0,9% de NaCl/éthanol (50/50 v/v) à une dose de 25 mg/kg (semaine 1), 37,5 mg/kg (semaine 2) et 80 mg/kg (semaine 3). 100  $\mu$ g de peptidoglycane de Ls33 est administré quotidiennement par voie orale aux souris, de la première à la troisième administration de TNBS. Les souris sont sacrifiées 48 h après la troisième administration de TNBS.

### Expression des gènes *Tslp* et *Aldh1a*

L'expression des gènes *Tslp* et *Aldh1a2* a été évaluée par PCR en temps réel utilisant la technologie SYBR Green. L'ARN des échantillons a été purifié à l'aide du kit Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Düren, Germany) et l'ADN complémentaire a été obtenu à l'aide du kit « High capacity cDNA reverse transcription kit » (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Les qRT-PCR ont été réalisées sur le Mx3005P à l'aide du Master Mix Brilliant II QPR low rox (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) et des amorces suivantes :

gène	amorce sens	amorce anti-sens
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>Tslp</i>	GAGAACAAGAGAAGCCCTCAATG	CTGGAGATTGCATGAAGGAATACC
<i>Aldh1a2</i>	CAGATGCTGACTTGGACTAC	ATAAGCTCCAGCACTTTGTT

L'expression relative des ARN ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) a été déterminée en comparant 1) les valeurs de cycle seuil (Ct) du gène d'intérêt et du gène de ménage *Actb* ( $\Delta Ct$ ) et 2) les valeurs  $\Delta Ct$  des souris traitées et des souris saines ( $\Delta\Delta Ct$ ).

# **DISCUSSION & PERSPECTIVES**

Les effets bénéfiques des bactéries lactiques dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin se sont révélés spécifiques de la souche utilisée et les mécanismes d'action de ces micro-organismes restent encore méconnus. Dans cette étude nous avons mis en évidence que le peptidoglycane est un composant actif dans la fonctionnalité des bactéries lactiques et que les capacités anti-inflammatoires des souches sont corrélées à la présence d'un mucopeptide, agoniste de NOD2, dérivé du peptidoglycane.

Le peptidoglycane a souvent été décrit comme une molécule immunostimulante impliquée dans la pathogénèse des bactéries (Boneca, 2005; Langer et al., 2008). L'utilisation de préparations commerciales avait tout d'abord suggéré que les effets pro-inflammatoires du peptidoglycane étaient associés à sa reconnaissance par le TLR2 (Chiu et al., 2009; Lin et al., 2010), initialement caractérisé comme le récepteur de l'immunité innée reconnaissant ce composant (Takeuchi et al., 1999; Yoshimura et al., 1999). Il a en effet été montré que les macrophages dérivés de souris TLR2<sup>-/-</sup> étaient incapables de sécréter les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$  en réponse au peptidoglycane commercial purifié de *Staphylococcus aureus* (Takeuchi et al., 1999).

Au sein de la paroi bactérienne, de nombreux composants bactériens sont liés de façon covalente les uns aux autres et des molécules immunostimulantes peuvent être copurifiées en même temps que le peptidoglycane lors de la fabrication des préparations commerciales. Des études comparant les effets du peptidoglycane commercial de *S. aureus* à ceux d'un peptidoglycane hautement purifié ont mis en évidence que l'activation du TLR2 par le peptidoglycane résultait en réalité d'une contamination des préparations commerciales par des lipoprotéines et des acides lipotéichoïques (Hashimoto et al., 2006; Travassos et al., 2004). Ces résultats ont d'ailleurs été confortés par le fait que le peptidoglycane purifié d'une souche ne possédant pas de lipoprotéines n'était plus capable d'activer le TLR2 (Volz et al., 2010). Il a également été mis en évidence que les préparations commerciales de peptidoglycane de *S. aureus* et de *Streptococcus pyogenes* sont contaminées avec des superantigènes bactériens qui stimulent la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-17 (Li et al., 2008).

Des études ont plus récemment démontré le rôle bénéfique du peptidoglycane de lactobacilles sur l'inflammation. Il a été mis en évidence qu'un complexe polysaccharide-peptidoglycane purifié de *L. casei* Shirota est capable d'inhiber la production d'IL-6 obtenue après stimulation de cellules de *lamina propria* de souris présentant une colite induite au DSS par du LPS. Cet effet anti-inflammatoire a été corrélé à une inhibition de la voie NF- $\kappa$ B. De plus, dans un modèle de cancer associé à la colite, ce complexe polysaccharide-peptidoglycane présente des effets anti-tumoraux et inhibe la production d'IL-6 par la muqueuse intestinale (Matsumoto et al., 2009). La capacité immunostimulante du

peptidoglycane semble dépendre de la capacité de la paroi des lactobacilles à être digérée. En effet, un traitement à la N-acétylmuramidase modifie les propriétés immuno-modulatrices de certains lactobacilles en réduisant leur capacité à induire la production d'IL-12 par des splénocytes (Sashihara et al., 2006) ou par des macrophages péritonéaux murins (Shida et al., 2006). Il a ainsi été suggéré qu'une paroi intacte et insoluble induit la production d'IL-12 par ces cellules immunes alors que du peptidoglycane soluble perd ses capacités immunostimulantes et peut favoriser le développement d'une réponse anti-inflammatoire. Par l'utilisation de mutants de lactobacilles, il a été montré au laboratoire que des modifications dans la composition de la paroi provoquent un changement dans les propriétés immuno-modulatrices d'une souche de *L. plantarum*, notamment en exacerbant ses capacités anti-inflammatoires (Grangette et al., 2005). Ces résultats ont suggéré que des changements de charges de surface pourraient entraîner une modification du turn-over de la paroi chez les mutants. De plus, le fait que des DC conditionnées par certains lactobacilles puissent conférer un effet protecteur via NOD2 a renforcé l'hypothèse de l'implication de la paroi et en particulier du peptidoglycane dans les capacités anti-inflammatoires des souches (Foligne et al., 2007b). Nous avons d'ailleurs au cours de notre travail confirmé le rôle crucial de NOD2 dans les capacités anti-inflammatoires des lactobacilles (Macho Fernandez et al., 2011). Il a été montré que des souris prétraitées avec du peptidoglycane de *S. aureus* présentent une réduction de l'inflammation et augmentation de la réponse immune innée suite à une infection par *S. aureus*. Ces effets sont indépendants des TLR2 et TLR4 (Murphey et al., 2008). De même, une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) et une augmentation de la cytokine IL-10 sont retrouvées dans le plasma de souris prétraitées avec du peptidoglycane de *S. aureus* puis infectées par *Pseudomonas aeruginosa* ou traitées avec du LPS (Murphey and Sherwood, 2008).

## **I. Quels sont les mécanismes cellulaires impliqués dans les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane de *Lactobacillus salivarius* Ls33 ?**

Le peptidoglycane que nous avons utilisé a été hautement purifié selon la méthode de Travassos et collaborateurs (Travassos et al., 2004) et est dépourvu de contaminants comme l'indique l'absence d'activation du TLR2. Nous avons tout d'abord mis en évidence que l'administration intra-péritonéale du peptidoglycane purifié de la souche anti-inflammatoire *L. salivarius* Ls33 protège les souris d'une colite expérimentale aiguë induite par l'administration de TNBS. La protection conférée par ce composant est associée, au niveau du côlon, à une diminution de l'expression de marqueurs de l'inflammation (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6) et à une augmentation de l'expression de deux gènes impliqués dans la voie immunosuppressive de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (*Indo* et *Ihng*). Bien que nous ayons

observé une diminution de l'expression du gène de l'IL-10 dans le côlon des souris traitées avec le peptidoglycane de Ls33, une augmentation de la production de la protéine IL-10 est retrouvée dans le côlon et dans les surnageants de culture des cellules de rate ou de MLN restimulées avec les anticorps  $\alpha$ -CD3 et  $\alpha$ -CD28. Par l'utilisation de souris IL-10<sup>-/-</sup>, nous avons démontré que les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane de Ls33 dépendaient de cette voie de signalisation. Nous avons également observé que l'effet protecteur de la souche Ls33 était corrélé à une production locale de la cytokine immunosuppressive IL-10 et que cet effet était perdu chez les souris NOD2<sup>-/-</sup>. Ces résultats corroborent une étude récente montrant qu'une mutation de *Nod2*, retrouvée chez les patients atteints de maladie de Crohn, inhibe la production d'IL-10 par des monocytes isolés de sang périphérique (Noguchi et al., 2009). Etant donné le rôle de l'IL-10 dans le contrôle de l'inflammation au sein des muqueuses, les auteurs ont suggéré que le défaut de production d'IL-10 chez les patients atteints de maladie de Crohn portant cette mutation pourrait conduire au développement de la maladie. Bien que ces résultats n'aient pas été obtenus avec la mutation équivalente chez la souris, une étude récente a mis en évidence le rôle de NOD2 dans la production d'IL-10 par des macrophages après stimulation par des fragments de paroi de *S. aureus* (Moreira et al., 2008). Ces résultats sont cependant en contradiction avec les travaux de Zeuthen et collaborateurs qui montrent que des DC Nod2<sup>-/-</sup> produisent plus d'IL-10 que des DC WT après stimulation par différentes souches de bactéries lactiques (Zeuthen et al., 2008b).

Les cellules Treg, notamment les Treg naturels CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, aident au maintien de l'homéostasie intestinale et de la tolérance en prévenant les réponses immunes innées et adaptatives inappropriées (Barnes and Powrie, 2009; Coombes et al., 2005). Des observations récentes ont mis en évidence que des DC muqueuses, exprimant le marqueur CD103 et produisant de l'acide rétinoïque et du TGF $\beta$ , favorisent la différenciation des Treg (Coombes et al., 2007). Les propriétés tolérogènes de cette population de DC sont abrogées dans le modèle de colite par transfert de cellules CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> chez les souris SCID, suggérant que, selon les situations, cette population de DC peut avoir différents rôles dans le contrôle de l'inflammation. Il semblerait que la perte des capacités tolérogènes des DC CD103<sup>+</sup> soit associée à une diminution de l'expression du gène codant pour une aldehyde déhydrogénase impliquée dans la conversion de la vitamine A en acide rétinoïque, *adh1a2* (Laffont et al., 2010). Afin de corréler la présence de DC régulatrices CD103<sup>+</sup> et l'expansion de cellules Treg CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> observées chez les souris traitées par le peptidoglycane de Ls33 dans le modèle de colite aiguë induite au TNBS, nous avons évalué l'expression de différents médiateurs produits par les DC et impliqués dans la différenciation des Treg. Par PCR en temps réel, nous avons mis en évidence que les DC de la *lamina propria* intestinale des souris traitées avec le peptidoglycane de Ls33 présentaient une augmentation de

l'expression du gène *adh1a2*, suggérant un rôle de l'acide rétinoïque dans les capacités protectrices du composant. La séparation des différentes sous populations de DC par tri cellulaire permettrait d'évaluer l'expression du gène *adh1a2* et l'activité de l'enzyme codée par celui-ci chez les DC CD103<sup>+</sup>. Il serait également intéressant d'étudier les effets protecteurs du peptidoglycane de Ls33 chez des souris déficientes pour le gène *aldh1a2*.

Une étude récente a mis en évidence que les DC CD103<sup>+</sup> de la *lamina propria* intestinale exprimant le gène *Indo*, impliqué dans la voie immunosuppressive de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), favorisent également le développement de cellules Treg CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Matteoli et al., 2010). Il a été préalablement montré au laboratoire qu'une augmentation de l'expression du gène *Indo* ainsi que celui de l'IFN $\gamma$  (*Ifn*g), principal inducteur de la voie IDO (Gurtner et al., 2003), est retrouvée dans le côlon de souris traitées avec des BMDC conditionnées par la souche Ls33 (Foligne et al., 2007a). Nos travaux indiquent également que l'effet protecteur du peptidoglycane de Ls33 est corrélé à une augmentation de l'expression des gènes *Indo* et *Ifn*g au niveau du côlon et de façon plus intéressante au sein des DC CD11c<sup>+</sup> purifiées des MLN et de la *lamina propria* intestinale. L'expression du gène codant pour l'IFN $\gamma$  n'est pas retrouvée au niveau des cellules CD4<sup>+</sup> des souris traitées avec le peptidoglycane de Ls33, ce qui exclu l'implication possible d'une réponse Th1. Afin de confirmer le rôle de la voie IDO dans les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane de Ls33, il serait intéressant d'évaluer l'effet protecteur de ce composant dans des expériences de colite réalisées chez des souris IDO<sup>-/-</sup> ou chez des souris sauvages traitées avec un inhibiteur de cette voie de signalisation, le 1-méthyl-tryptophane.

Au niveau de la muqueuse intestinale, les capacités tolérogènes des DC semblent être favorisées par le microenvironnement local. Il a ainsi été montré que la production de TSLP par les cellules épithéliales participe à l'homéostasie intestinale, sa dérégulation étant associée à l'établissement de l'inflammation. De plus, l'expression du gène codant pour la TSLP n'est pas détectable chez 70% des patients atteints de maladie de Crohn, renforçant son rôle dans l'homéostasie intestinale (Rimoldi et al., 2005). Par PCR en temps réel, nous avons montré que les capacités protectrices du peptidoglycane de Ls33 sont associées à l'augmentation de l'expression du gène de la TSLP au niveau du côlon. Ces résultats préliminaires doivent cependant être étayés, notamment en évaluant les capacités de la souche Ls33 ou de son peptidoglycane à activer la production de ce facteur par les cellules épithéliales (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*).

Le rôle potentiel de l'induction de DC régulatrices observée *in vivo* dans les capacités protectrices du peptidoglycane de Ls33 a été conforté par des données *in vitro* montrant que le peptidoglycane de Ls33 favorise le développement de DC partiellement matures productrices d'IL-10. Le transfert adoptif de ces DC à profil régulateur est capable de protéger les souris de la colite expérimentale induite au TNBS. L'effet protecteur des DC est

totallement aboli lorsqu'elles sont dérivées de souris déficientes pour le récepteur NOD2, supportant l'hypothèse que l'effet tolérogène du peptidoglycane de Ls33 s'effectue par l'induction de DC régulatrices via la signalisation NOD2.

Au sein de la muqueuse intestinale, la population de DC CD103<sup>-</sup> caractérisée par l'expression du marqueur CX<sub>3</sub>CR1 est impliquée dans la mise en place des réponses inflammatoires Th1 et Th17 et dans le développement de colites expérimentales murines induites par le transfert de lymphocytes T CD45RB<sup>high</sup> ou par du DSS (Kostadinova et al., 2010; Niess and Adler, 2010). Il serait donc intéressant d'évaluer le rôle de cette sous-population de DC dans notre modèle de colite induite au TNBS puis de déterminer si le peptidoglycane de Ls33 est capable de moduler/réprimer l'expansion de cette population de DC. Ces études pourraient être effectuées chez des souris CX<sub>3</sub>CR1-GFP.

Nous avons également démontré que l'effet protecteur du peptidoglycane de Ls33 pouvait également être obtenu après administration du composant par voie orale. De façon importante, la dose active (100-200 µg de peptidoglycane par souris par jour) est physiologique puisqu'elle correspond à la quantité de peptidoglycane contenue dans une dose classique de lactobacilles probiotiques administrée de façon journalière aux souris (10<sup>8</sup> CFU) avant le déclenchement de la colite.

L'ensemble de ces résultats supporte le fait que le peptidoglycane de Ls33 favorise le développement d'une réponse tolérogène.

Une augmentation de l'expression de l'IL-23 et une réponse aberrante Th17 ont été observées chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Ahern et al., 2008). Les cellules Th17 se différencient en présence de TGFβ et d'IL-6 et sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription RORγt. Ces cellules, qui produisent de l'IL-17A, de IL-17F et de l'IL-22 sont maintenues par l'IL-23. La composition du microbiote semble influencer la balance Th17/Treg ce qui pourrait favoriser le maintien de l'homéostasie intestinale ou au contraire la susceptibilité aux maladies inflammatoires (Ivanov et al., 2008). Nous n'avons pas pu mettre en évidence l'induction d'une réponse Th17 avec le modèle de colite aiguë induit par le TNBS que nous avons utilisé. De ce fait, il n'a pas été possible d'évaluer l'effet du peptidoglycane de Ls33 sur la balance Th17/Treg. Notre modèle étant très rapide (48 à 72 h), nous avons décidé de mettre en place un modèle d'inflammation chronique, mimant au mieux la pathologie humaine. Ce modèle repose sur l'administration successive, à une semaine d'intervalle, de doses croissantes de TNBS. L'effet protecteur du peptidoglycane de Ls33 a été évalué après administration quotidienne du composant par voie orale de la première à la troisième administration de TNBS. Les résultats préliminaires obtenus montrent que ce modèle de colite permet la mise en place d'une réponse Th17 comme l'indique l'augmentation de l'expression du gène de l'IL-17A au

niveau du côlon. Bien que l'administration du peptidoglycane de Ls33 ait diminué les dommages histologiques, réduit l'expression de gènes pro-inflammatoires dans le côlon (*Ilf* et *Cxcl2*) et augmenté l'expression du gène codant *FoxP3*, facteur de transcription des cellules Treg naturels, elle n'a pas été capable de diminuer la réponse Th17. De façon surprenante, chez des souris saines, l'administration orale du composant pendant 15 jours a provoqué une augmentation de l'expression du gène de l'IL-17A au niveau du côlon.

Des travaux récents mettent en avant la plasticité et l'hétérogénéité des Th17. Certaines études ont notamment mis en évidence un rôle bénéfique des Th17 dans les mécanismes de défense contre des infections bactériennes et dans la réparation tissulaire via la production d'IL-22 (Ouyang et al., 2008). De plus, dans un modèle de colite induite par le transfert de cellules CD45RB<sup>high</sup> chez des souris immunodéficientes, il a été montré que l'IL-17A supprimait le développement de l'inflammation en inhibant la réponse Th1 (O'Connor et al., 2009). Une population de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 a récemment été identifiée chez l'homme (Voo et al., 2009). Ces cellules, qui co-expriment les facteurs de transcription FOXP3 et ROR $\gamma$ t, présentent des capacités immunosuppressives *in vitro*. Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> immunosuppresseurs ont également été caractérisés dans la muqueuse de patients atteints de maladie de Crohn, suggérant que l'environnement inflammatoire de la muqueuse intestinale contribue à la génération de cellules Treg FoxP3<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 (Hovhannisyan et al., 2011). Il nous semble donc important d'approfondir la caractérisation des cellules Treg FoxP3<sup>+</sup>, notamment en suivant l'expansion des Treg par cytométrie en flux ou par imagerie en utilisant des souris transgéniques FoxP3-GFP puis en déterminant leur phénotype complet par cytométrie en flux ou PCR en temps réel.

## **II. Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane de *Lactobacillus salivarius* Ls33 ?**

### **A. Induction de la tolérance**

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la production de médiateurs pro-inflammatoires induite après une stimulation de NOD2 jouent un rôle clé dans l'immunité innée et plus particulièrement dans la protection contre des infections bactériennes au niveau intestinal (Kobayashi et al., 2005; Netea et al., 2005; Uehara et al., 2005).

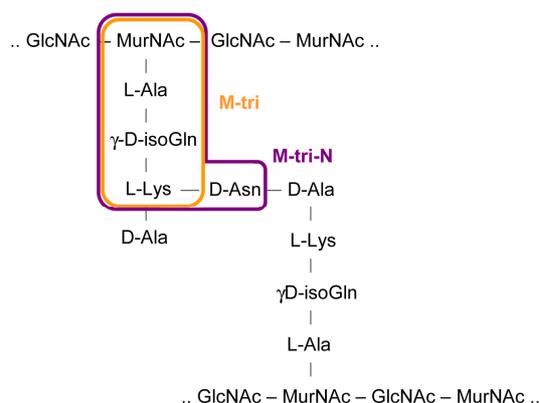
Puisque des variations du gène *Nod2* sont associées à une susceptibilité à la maladie de Crohn (Hugot et al., 2001), il a été suggéré que certaines mutations aboutissent à un défaut de reconnaissance du microbiote et à une réponse immune inflammatoire anormale médiée par les lymphocytes T (Inohara et al., 2003). Alors que certains travaux montrent que les mutations de *Nod2* retrouvées chez les patients atteints de maladie de Crohn favorisent

l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Maeda et al., 2005; Uehara et al., 2005; van Beelen et al., 2007), d'autres soutiennent que ces mutations mènent à un défaut de l'activation de NF- $\kappa$ B (Inohara et al., 2003). Watanabe et collaborateurs ont démontré que l'activation de NOD2 par du MDP régule négativement les réponses initiées par le TLR2 et inhibe les réponses Th1 (Watanabe et al., 2004). Ces auteurs ont également montré que du MDP synthétique protège les souris de la colite de manière NOD2-dépendante (Watanabe et al., 2008). Ces résultats supportent l'hypothèse que la signalisation NOD2 peut inhiber l'inflammation et que des mutations du gène *Nod2* contribuent à une inflammation initiée par une réponse cytokinique excessive après activation du TLR2.

Les cellules immunes intestinales sont continuellement exposées aux bactéries et à leurs composants, notamment des produits de dégradation du peptidoglycane agonistes de NOD2. En mimant les conditions retrouvées au sein de l'intestin, Hedl et collaborateurs ont mis en évidence qu'une stimulation chronique de NOD2 par le MDP inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-8) par des macrophages humains restimulés avec du MDP (« self-tolérance ») ou par des agonistes des TLR2 et TLR4 (« cross-tolérance »). La perte de cet effet chez des macrophages de patients atteints de maladie de Crohn présentant la mutation homozygote *Leu1007insC* indique que la région de reconnaissance du ligand de NOD2 est essentielle à la tolérance induite par le MDP (Hedl et al., 2007). L'hypothèse soutenant qu'une stimulation chronique de NOD2 est importante pour le maintien de la tolérance est supportée par le fait que l'administration de MDP protège les souris de la colite expérimentale en inhibant la signalisation TLR (Watanabe et al., 2004) et que du peptidoglycane intracellulaire est retrouvé dans les entérocytes (Kullberg et al., 2008). Par l'utilisation de DC transgéniques présentant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de NF- $\kappa$ B, nous montrons qu'un long prétraitement (24 h) des DC par le peptidoglycane de Ls33 est capable d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B induite par les agonistes des TLR2 et TLR4. Cet effet inhibiteur n'étant pas retrouvé après un court prétraitement des DC (2 h) avec le peptidoglycane de la Ls33, nous pouvons suggérer que le peptidoglycane de Ls33 est capable d'induire un phénomène de tolérance et contribue de ce fait à l'homéostasie intestinale. Très récemment, il a été montré que le phénomène de « cross-tolérance » provoqué par une stimulation chronique de NOD2 résulte de la production de médiateurs anti-inflammatoires (IL-10, TGF $\beta$ , IL-1Ra) et implique la voie de signalisation de mTOR (mammalian target of rapamycin), une enzyme impliquée dans la croissance, la différenciation et l'activation cellulaire (Hedl and Abraham, 2011). Il serait donc intéressant d'évaluer les effets d'inhibiteurs de ces voies de signalisation.

## B. Libération du muramyl-tri-Lysine, un muropeptide agoniste de NOD2 présentant des capacités anti-inflammatoires

Nous avons mis en évidence que le peptidoglycane purifié d'une souche anti-inflammatoire (Ls33) était capable de promouvoir une réponse immunorégulatrice aboutissant au retour à l'homéostasie intestinale. De façon intéressante, nous avons observé que le peptidoglycane de la souche immunostimulante *Lactobacillus acidophilus* NCFM ne présentait pas de capacités anti-inflammatoires, suggérant que les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane sont spécifiques de souche. Puisque les deux souches comparées dans cette étude présentent un peptidoglycane de type Lys comprenant des ponts interpeptidiques L-Lys-D-Asn, nous avons émis l'hypothèse que les différences de capacités anti-inflammatoires entre les deux peptidoglycanes sont liées à une différence de leur turn-over qui affecterait la libération de muropeptides bioactifs. Alors qu'après un traitement à la mutanolysine le peptidoglycane des deux souches libère le muropeptide GlcNAc-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-isoGln-L-Lys-D-Asn (M-tri-Lys-D-Asn), seul le peptidoglycane de Ls33 produit le muropeptide GlcNAc-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-isoGln-L-Lys (M-tri-Lys) préalablement identifié comme agoniste de NOD2 (Girardin et al., 2003c).



**Figure 18 : Représentation des muropeptides M-tri-Lys (M-tri) et M-tri-Lys-D-Asn (M-tri-N).**

Composition des muropeptides libérés par *L. salivarius* Ls33 (M-tri et M-tri-N) et *L. acidophilus* NCFM (M-tri-N).

Afin de relier les capacités protectrices des lactobacilles et de leur peptidoglycane à la présence exclusive de ce muropeptide, il est important d'analyser la structure du peptidoglycane d'un plus grand nombre de souches sauvages et de paires isogéniques de mutants présentant des capacités immuno-modulatrices opposées. Il a été observé au laboratoire que, contrairement à la souche sauvage, divers mutants de surface de *L. acidophilus* NCFM, obtenus en collaboration avec l'équipe de Todd Klaenhammer (North Carolina State University, USA), exercent des capacités anti-inflammatoires *in vitro* (induction d'IL-10) et *in vivo* (protection dans le modèle de colite au TNBS). Au cours de cette thèse, nous avons initié, au sein du laboratoire du Dr Ivo Boneca, la purification du peptidoglycane de ces mutants ainsi que de ceux de la souche *L. plantarum* sauvage et du mutant *dlt* affecté dans la synthèse des LTA qui présente lui aussi une exacerbation des

capacités anti-inflammatoires (Grangette et al., 2005). L'analyse des profils des peptidoglycanes par HPLC indique d'importantes modifications de leur structure (Annexe 1). La caractérisation des différents mucopeptides par spectrométrie de masse est en cours de réalisation en collaboration avec le Dr Ivo Boneca.

Afin de mieux comprendre les différences de structure des peptidoglycanes dans les différentes souches sauvages et mutantes, il est également envisageable de suivre l'activité de certaines enzymes impliquées dans le turn-over de la paroi par la technique du zymogramme. Il est également important de vérifier si les mucopeptides identifiés sont libérés dans le milieu extérieur au cours du turn-over de la paroi. Ceci devrait être réalisé en évaluant la structure des produits de dégradation de la paroi dans le surnageant de culture de bactéries radiomarquées par chromatographie d'exclusion et HPLC puis par spectrométrie de masse. L'analyse du turn-over global pourrait également être appréhendée par des expériences de chasse après culture des bactéries en présence de N-acétylglucosamine ou d'acide *meso*-diaminopymélique marqués à la thymidine tritiée. Nous avons initié ces travaux au sein du laboratoire du Dr Ivo Boneca mais ces expériences sont à poursuivre pour pouvoir en tirer des conclusions.

### **C. Les deux mucopeptides libérés, ligands de NOD2, n'exercent pas les mêmes capacités protectrices : différences dans le transport des molécules ?**

Nous avons montré que les peptidoglycanes de Ls33 et de NCFM ainsi que les deux mucopeptides sont reconnus par NOD2 mais que seul le peptidoglycane de Ls33 et le M-tri-Lys qui en dérive sont capables de protéger les souris de la colite expérimentale. Cette activation de NOD2 par les peptidoglycanes et les mucopeptides a été évaluée *in vitro* par la transfection d'un plasmide portant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de NF- $\kappa$ B dans des cellules HEK 293, exprimant de façon stable ou non NOD2, perméabilisées par lipofection. Ce modèle, qui induit un biais en permettant à n'importe quelle molécule de se retrouver dans le cytoplasme et donc d'être détectée par NOD2, ne reflète pas les processus physiologiques d'internalisation et de reconnaissance par NOD2 des peptidoglycanes ou des mucopeptides *in vivo*.

Les mécanismes par lesquels le peptidoglycane entre dans les cellules et induit une réponse immune en conditions physiologiques restent encore méconnus. La prise en charge d'antigènes exogènes est un processus essentiel pour toutes les cellules eucaryotes. Les cellules peuvent internaliser des nutriments et des facteurs de croissance et des cellules spécialisées peuvent faire disparaître des matériaux non désirés ou en quantité excessive de la circulation ou des fluides tissulaires afin de maintenir l'homéostasie. Il existe quatre voies principales pour l'internalisation de macromolécules et de particules : l'endocytose par des puits recouverts de clathrine, la macropinocytose, la phagocytose et l'endocytose médiée par

des cavéoles. L'endocytose par des puits recouverts de clathrine est impliquée dans une variété de fonctions cellulaires alors que la phagocytose est généralement restreinte à des cellules spécialisées comme les macrophages, les DC et les neutrophiles.

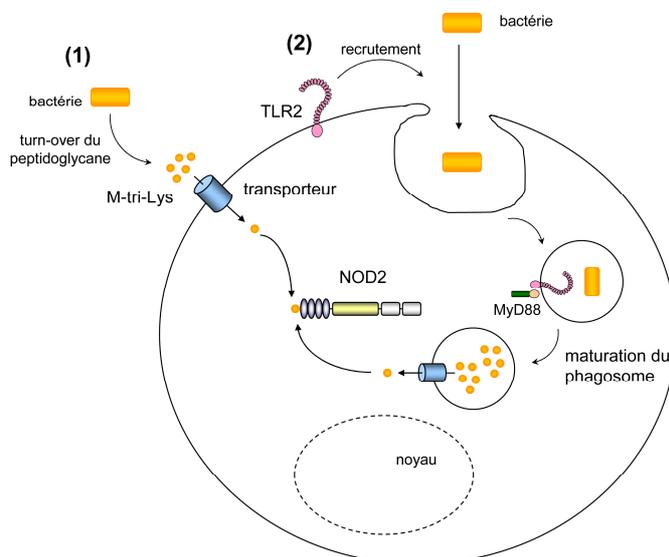
Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'internalisation du peptidoglycane et de ses dérivés : du MDP peut être endocyté par les macrophages ou des cellules épithéliales via un mécanisme dépendant de la clathrine et la dynamine (Lee et al., 2009; Marina-Garcia et al., 2009) ; des vésicules dérivées de bactéries peuvent délivrer des fragments de peptidoglycane au sein des cellules épithéliales en passant par les radeaux lipidiques, des structures particulières riches en glycosphingolipides et en cholestérol ; un complexe peptidoglycane-PGLYRP3 peut être endocyté au sein des cellules épithéliales via un mécanisme dépendant du TLR2 (Bu et al., 2010).

Une étude récente a montré que l'activité biologique du peptidoglycane polymérique requiert son internalisation, sa prise en charge par les phagosomes et son hydrolyse par le lysosyme (Iyer et al., 2010). Cependant la nature des ligands NOD2 dérivés de la digestion lysosomale du peptidoglycane est encore méconnue. Les composants monomériques MDP et les peptides comprenant du *meso*-DAP ont été isolés après digestion du peptidoglycane par de la mutanolysine. Les lysosomes des cellules immunes, monocytes et neutrophiles, produisent du lysosyme suggérant que les monomères identifiés peuvent être des produits de la digestion du peptidoglycane par ces cellules immunes. Nous pouvons ainsi spéculer que l'endocytose, la digestion lysosomale et la reconnaissance des produits de dégradation du peptidoglycane par les récepteurs NOD peuvent être les mécanismes par lesquels les cellules immunes sont activées par le peptidoglycane.

Chez les cellules immunes, la maturation du phagosome, nécessaire à l'activité biologique du peptidoglycane, semble être contrôlée par des signaux TLR et par l'adaptateur MyD88 (Blander, 2007; Blander and Medzhitov, 2004, 2006). Dans ce modèle, la phagocytose d'un micro-organisme pathogène entraîne le recrutement de TLR au sein du phagosome en formation. La reconnaissance des MAMP par les TLR active l'adaptateur MyD88 qui recrute différents effecteurs et initie une cascade de signalisation aboutissant à la maturation du phagosome. Ce mode de phagocytose inductible est caractérisé par une augmentation du taux de fusion du phagosome naissant avec des endosomes et des lysosomes permettant la dégradation du contenu du phagosome et la présentation des antigènes par le CMH II (Blander and Medzhitov, 2004, 2006). Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi les effets protecteurs du peptidoglycane de Ls33 nécessitent la présence de l'adaptateur MyD88 et sont partiellement dépendants du TLR2. Afin de confirmer l'implication de ce processus dans les capacités anti-inflammatoires du peptidoglycane il serait intéressant d'évaluer dans le modèle de colite aiguë induite au TNBS les capacités

protectrices du peptidoglycane de Ls33 digéré par des enzymes (lysozyme, mutanolysine) chez des souris MyD88<sup>-/-</sup>.

Les produits de dégradation du peptidoglycane doivent ensuite atteindre le cytoplasme afin d'être détectés par les récepteurs NOD intracytosolique. La délivrance de ligands NOD2 dans le cytoplasme a récemment été corrélée à la présence des transporteurs de di/tri-peptides PepT1 et PepT2 au sein des cellules épithéliales ou des phagocytes (Charriere et al., 2010; Ismail et al., 2006; Marina-Garcia et al., 2009; Vavricka et al., 2004). Le transport des ligands dérivés du peptidoglycane peut intervenir à deux niveaux : 1) après internalisation et dégradation de bactéries dans les phagolysosomes, les produits de dégradations doivent être libérés dans le cytoplasme ou 2) des muuropeptides libérés lors de la croissance bactérienne au niveau extracellulaire peuvent être transportés directement dans le cytosol.



**Figure 19 : Schéma hypothétique de l'activation de NOD2 par le M-tri-Lys.**

Chez les cellules immunes, deux modèles non exclusifs pourraient expliquer l'activation de NOD2 par le M-tri-Lys. (1) Du M-tri-Lys, libéré lors du turn-over du peptidoglycane, est pris en charge par un transporteur membranaire qui le délivre dans le cytosol. (2) La bactérie est internalisée et dégradée par un processus de phagocytose nécessitant un recrutement des TLR et la voie de signalisation MyD88. Les produits de dégradations de la bactérie, générés dans le phagolysosome, sont ensuite transportés dans le cytoplasme.

PepT1 est exprimé principalement au niveau de la bordure en brosse des entérocytes du petit intestin. Bien que le PepT1 humain (hPepT1) ne soit pas retrouvé dans les cellules épithéliales de côlon en condition physiologique, il est exprimé à la membrane apicale des cellules épithéliales de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Merlin et al., 2001; Ogihara et al., 1996; Ziegler et al., 2002). On le retrouve également exprimé dans la membrane des macrophages de la *lamina propria* intestinale (Charrier et al., 2006; Merlin et al., 2001). PepT1 a pour fonction de co-transporter des protons et des petits peptides. Il transporte de nombreux peptides de nature différente, des drogues dérivées de peptides et le tripeptide bactérien fMLP (N-formyl-metionyl-Leucyl-Phénylalanine) qui participe à l'inflammation en recrutant des neutrophiles (Buyse et al., 2002; Merlin et al., 1998). Plus récemment, il a été montré que hPepT1 transporte le MDP (Vavricka et al., 2004) et le

tripeptide anti-inflammatoire KPV (Lysine-Proline-Valine) (Dalmasso et al., 2008). Dans un modèle d'expression ectopique de hPepT1 dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, il a été montré que hPepT1 transporte efficacement le MDP mais aucun autre ligand de NOD2 ou de NOD1 (Ismair et al., 2006). Du fait de sa surexpression chez les patients atteints de maladie de Crohn et de son activité de transport, PepT1 constitue une cible potentielle pour de nouvelles thérapies anti-inflammatoires. Cependant, le fait que l'activation de NOD2 chez des macrophages déficients pour PepT1 ne soit pas altérée après stimulation par du MDP suggère que PepT1 ne semble pas impliqué dans le transport du mucopeptide dans ces cellules (Marina-Garcia et al., 2009). Le transport du MDP au sein des macrophages serait plutôt associé au transporteur PepT2. En effet, il a été mis en évidence que PepT2 est associé aux membranes des phagosomes des macrophages et qu'il est également capable de transporter le MDP (Charriere et al., 2010). En fonction de ces données bibliographiques nous pourrions imaginer que le peptidoglycane polymérique soit internalisé par un processus de phagocytose impliquant le recrutement de TLR et la voie MyD88, hydrolysé dans le phagosome et que ses produits de dégradation soient libérés dans le cytosol via le transporteur de di- ou tripeptides PepT2 avant d'être détectés par NOD2. Ceci pourrait expliquer pourquoi d'une part les effets protecteurs du peptidoglycane dépendent de la voie MyD88 et d'autre part pourquoi le tripeptide M-tri-Lys, et pas le térapeptide M-tri-Lys-D-Asn, exerce des capacités anti-inflammatoires. Il serait donc intéressant d'évaluer l'implication de PepT2 dans l'effet protecteur du M-tri-Lys en réalisant notre modèle de colite chez des souris sauvages ou déficientes pour ce récepteur.

En conclusion, ce travail de thèse a mis en évidence que les capacités anti-inflammatoires des bactéries lactiques sont corrélées à la présence d'un mucopeptide reconnu par NOD2 et libéré par le peptidoglycane. Ces travaux permettent de relier la structure de la paroi et en particulier celle du peptidoglycane aux capacités anti-inflammatoires spécifiques de souche des lactobacilles. Ces données apportent également des critères supplémentaires pour une sélection optimale des souches de bactéries lactiques pour de futures applications thérapeutiques ou prophylactiques, en particulier dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Nous pouvons également proposer l'utilisation de peptidoglycane mais surtout du M-tri-Lys, qui peut être synthétisé très facilement, comme de nouveaux outils d'immuno-intervention, non seulement dans la prise en charge des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ne présentant pas de mutation dans *Nod2* mais également dans d'autres pathologies associées à des déséquilibres du système immunitaire.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adlerberth, I., and Wold, A.E. (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta paediatrica* *98*, 229-238.
- Ahern, P.P., Izcue, A., Maloy, K.J., and Powrie, F. (2008). The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunological reviews* *226*, 147-159.
- Ahmed, M., Prasad, J., Gill, H., Stevenson, L., and Gopal, P. (2007). Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects. *The journal of nutrition, health & aging* *11*, 26-31.
- Akashi, S., Nagai, Y., Ogata, H., Oikawa, M., Fukase, K., Kusumoto, S., Kawasaki, K., Nishijima, M., Hayashi, S., Kimoto, M., *et al.* (2001). Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *International immunology* *13*, 1595-1599.
- Akira, S. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Advances in immunology* *78*, 1-56.
- Akira, S. (2006). TLR signaling. *Current topics in microbiology and immunology* *311*, 1-16.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* *2*, 675-680.
- Aldhous, M.C., Noble, C.L., and Satsangi, J. (2009). Dysregulation of human beta-defensin-2 protein in inflammatory bowel disease. *PLoS one* *4*, e6285.
- Alemka, A., Clyne, M., Shanahan, F., Tompkins, T., Corcionivoschi, N., and Bourke, B. (2010). Probiotic colonization of the adherent mucus layer of HT29MTXE12 cells attenuates *Campylobacter jejuni* virulence properties. *Infection and immunity* *78*, 2812-2822.
- 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*, 732-738.
- Ameho, C.K., Adjei, A.A., Harrison, E.K., Takeshita, K., Morioka, T., Arakaki, Y., Ito, E., Suzuki, I., Kulkarni, A.D., Kawajiri, A., *et al.* (1997). Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* *41*, 487-493.
- Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Ozören, N., Brady, G., Meshinchi, S., Jagirdar, R., Gewirtz, A., Akira, S., and Núñez, G. (2006). *The Journal of biochemical chemistry* *281*, 35217-35223.
- Anjuere, F., Luci, C., Lebens, M., Rousseau, D., Hervouet, C., Milon, G., Holmgren, J., Ardavin, C., and Czerkinsky, C. (2004). In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. *The Journal of immunology* *173*, 5103-5111.
- Aragon, G., Graham, D.B., Borum, M., and Doman, D.B. (2010). Probiotic therapy for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology & hepatology* *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. *Journal of gastroenterology* *40*, 16-23.
- Asong, J., Wolfert, M.A., Maiti, K.K., Miller, D., and Boons, G.J. (2009). Binding and Cellular Activation Studies Reveal That Toll-like Receptor 2 Can Differentially Recognize Peptidoglycan from Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *The Journal of biological chemistry* *284*, 8643-8653.
- Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., *et al.* (2008). ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* *455*, 808-812.
- 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. *Journal of leukocyte biology* *84*, 468-476.
- 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. *International journal of clinical practice* *60*, 284-288.
- Baker, K., Qiao, S.W., Kuo, T., Kobayashi, K., Yoshida, M., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2009). Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn. *Seminars in immunopathology* *31*, 223-236.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.

- Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P., and Sheron, N. (2003). Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *The Journal of pathology* 199, 28-35.
- Barnes, M.J., and Powrie, F. (2009). Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 31, 401-411.
- Barnich, N., Aguirre, J.E., Reinecker, H.C., Xavier, R., and Podolsky, D.K. (2005). Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition. *The Journal of cell biology* 170, 21-26.
- Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., *et al.* (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature genetics* 40, 955-962.
- Baumgart, D.C., Metzke, D., Schmitz, J., Scheffold, A., Sturm, A., Wiedenmann, B., and Dignass, A.U. (2005). Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* 54, 228-236.
- Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369, 1641-1657.
- Benveniste, J., Lespinats, G., and Salomon, J. (1971). Serum and secretory IgA in axenic and holoxenic mice. *The Journal of immunology* 107, 1656-1662.
- 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, 413-422.
- 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, 185-195.
- Bickert, T., Trujillo-Vargas, C.M., Duechs, M., Wohlleben, G., Polte, T., Hansen, G., Oelschlaeger, T.A., and Erb, K.J. (2009). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 suppresses allergen-induced Th2 responses in the airways. *International archives of allergy and immunology* 149, 219-230.
- Biswas, D., Qureshi, O.S., Lee, W.Y., Croudace, J.E., Mura, M., and Lammas, D.A. (2008). ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC immunology* 9, 35.
- Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2004). Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 304, 1014-1018.
- Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440, 808-812.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., *et al.* (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525.
- Borruel, N., Carol, M., Casellas, F., Antolin, M., de Lara, F., Espin, E., Naval, J., Guarner, F., and Malagelada, J.R. (2002). Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 51, 659-664.
- Bossen, C., and Schneider, P. (2006). BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Seminars in immunology* 18, 263-275.
- Boyden, E.D., and Dietrich, W.F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nature genetics* 38, 240-244.
- 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. *The American journal of clinical nutrition* 80, 1618-1625.
- Brand, S., Staudinger, T., Schnitzler, F., Pfennig, S., Hofbauer, K., Dambacher, J., Seiderer, J., Tillack, C., Konrad, A., Crispin, A., *et al.* (2005). The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 11, 645-652.

- 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. *The Journal of experimental medicine* 204, 1891-1900.
- Buyse, M., Tsocas, A., Walker, F., Merlin, D., and Bado, A. (2002). PepT1-mediated fMLP transport induces intestinal inflammation in vivo. *American journal of physiology - cell physiology* 283, C1795-1800.
- Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., and Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American journal of physiology* 292, G315-322.
- Cadioux, P.A., Burton, J., Devillard, E., and Reid, G. (2009). *Lactobacillus* by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of physiology and pharmacology* 60 Suppl 6, 13-18.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., *et al.* (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology* 4, 702-707.
- Charrier, L., Driss, A., Yan, Y., Nduati, V., Klapproth, J.M., Sitaraman, S.V., and Merlin, D. (2006). hPepT1 mediates bacterial tripeptide fMLP uptake in human monocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86, 490-503.
- Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *The Journal of experimental medicine* 203, 2841-2852.
- Chirido, F.G., Millington, O.R., Beacock-Sharp, H., and Mowat, A.M. (2005). Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *European journal of immunology* 35, 1831-1840.
- Chiu, Y.C., Lin, C.Y., Chen, C.P., Huang, K.C., Tong, K.M., Tzeng, C.Y., Lee, T.S., Hsu, H.C., and Tang, C.H. (2009). Peptidoglycan enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, focal adhesion kinase, Akt, and AP-1- dependent pathway. *The Journal of immunology* 183, 2785-2792.
- Choe, J., Kelker, M.S., and Wilson, I.A. (2005). Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309, 581-585.
- Christensen, H.R., Frokiaer, H., and Pestka, J.J. (2002). *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of immunology* 168, 171-178.
- Cloud-Hansen, K.A., Peterson, S.B., Stabb, E.V., Goldman, W.E., McFall-Ngai, M.J., and Handelsman, J. (2006). Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nature reviews microbiology* 4, 710-716.
- Contractor, N., Louten, J., Kim, L., Biron, C.A., and Kelsall, B.L. (2007). Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *The Journal of immunology* 179, 2690-2694.
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J., Campbell, B.J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature medicine* 16, 90-97.
- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., and Gahan, C.G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7617-7621.
- Dalmaso, G., Cottrez, F., Imbert, V., Lagadec, P., Peyron, J.F., Rampal, P., Czerucka, D., Groux, H., Foussat, A., and Brun, V. (2006). *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology* 131, 1812-1825.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405-1413.
- de Vrese, M., and Marteau, P.R. (2007). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *The Journal of nutrition* 137, 803S-811S.
- 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. *European journal of immunology* 22, 2831-2839.

- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., and Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 159-184.
- Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature immunology* 8, 1086-1094.
- Deshmukh, H.S., Hamburger, J.B., Ahn, S.H., McCafferty, D.G., Yang, S.R., and Fowler, V.G., Jr. (2009). Critical role of NOD2 in regulating the immune response to *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity* 77, 1376-1382.
- 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. *The Journal of immunology* 174, 3237-3246.
- Didierlaurent, A., Ferrero, I., Otten, L.A., Dubois, B., Reinhardt, M., Carlsen, H., Blomhoff, R., Akira, S., Kraehenbuhl, J.P., and Sirard, J.C. (2004). Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *The Journal of immunology* 172, 6922-6930.
- Drakes, M., Blanchard, T., and Czinn, S. (2004). Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infection and immunity* 72, 3299-3309.
- Dubin, P.J., and Kolls, J.K. (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunological reviews* 226, 160-171.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., *et al.* (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-1463.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., *et al.* (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition* 73, 386S-392S.
- Dziarski, R., and Gupta, D. (2005). *Staphylococcus aureus* peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infection and immunity* 73, 5212-5216.
- Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2006). Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular cell* 22, 245-257.
- 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, 1635-1638.
- Eitel, J., Krull, M., Hocke, A.C., N'Guessan, P.D., Zahlten, J., Schmeck, B., Slevogt, H., Hippenstiel, S., Suttrop, N., and Opitz, B. (2008). Beta-PIX and Rac1 GTPase mediate trafficking and negative regulation of NOD2. *The Journal of immunology* 181, 2664-2671.
- 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. *American journal of physiology* 295, G1025-1034.
- Ewaschuk, J.B., Walker, J.W., Diaz, H., and Madsen, K.L. (2006). Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. *The Journal of nutrition* 136, 1483-1487.
- Fallarino, F., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Asselin-Paturel, C., Fioretti, M.C., Trinchieri, G., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2005). Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *International immunology* 17, 1429-1438.
- Feleszko, W., Jaworska, J., Rha, R.D., Steinhausen, S., Avagyan, A., Jaudszus, A., Ahrens, B., Groneberg, D.A., Wahn, U., and Hamelmann, E. (2007). Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clinical & experimental allergy* 37, 498-505.
- Feller, M., Huwiler, K., Schoepfer, A., Shang, A., Furrer, H., and Egger, M. (2010). Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease: systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clinical infectious disease* 50, 473-480.

- Ferwerda, G., Girardin, S.E., Kullberg, B.J., Le Bourhis, L., de Jong, D.J., Langenberg, D.M., van Crevel, R., Adema, G.J., Ottenhoff, T.H., Van der Meer, J.W., *et al.* (2005). NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens* 1, 279-285.
- Fisher, S.A., Tremelling, M., Anderson, C.A., Gwilliam, R., Bumpstead, S., Prescott, N.J., Nimmo, E.R., Massey, D., Berzuini, C., Johnson, C., *et al.* (2008). Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature genetics* 40, 710-712.
- Foligne, B., Grangette, C. and Pot, B (2005). Probiotics in IBD: mucosal and systemic routes of administration may promote similar effects. *Gut* 54, 727-728.
- Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., and Pot, B. (2007a). Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World journal of gastroenterology* 13, 236-243.
- Foligne, B., Zoumpopoulou, G., Dewulf, J., Ben Younes, A., Chareyre, F., Sirard, J.C., Pot, B., and Grangette, C. (2007b). A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS ONE* 2, e313.
- 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, 6453-6457.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.D., Ozören, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., and Núñez, G. (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nature immunology* 7, 576-582
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13780-13785.
- Franks, I. (2010). Pediatrics: Probiotics reduce the risk of necrotizing enterocolitis. *Nature reviews gastroenterology & hepatology* 7, 358.
- Frolova, L., Drastich, P., Rossmann, P., Klimesova, K., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *Journal of histochemistry & cytochemistry* 56, 267-274.
- Fuentes, S., Egert, M., Jimenez-Valera, M., Ramos-Cormenzana, A., Ruiz-Bravo, A., Smidt, H., and Monteoliva-Sanchez, M. (2008). Administration of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Research in microbiology* 159, 237-243.
- Fujimori, S., Tatsuguchi, A., Gudis, K., Kishida, T., Mitsui, K., Ehara, A., Kobayashi, T., Sekita, Y., Seo, T., and Sakamoto, C. (2007). High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22, 1199-11204.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70.
- Fukata, M., Michelsen, K.S., Eri, R., Thomas, L.S., Hu, B., Lukasek, K., Nast, C.C., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., *et al.* (2005). Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *American journal of physiology* 288, G1055-1065.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology* 66, 365-378.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Kennedy, A., Cummings, J.H., Walsh, S.V., O'neil, D.A., and Macfarlane, G.T. (2005). Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 54, 242-249.
- Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R.S., *et al.* (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation* 113, 1490-1497.
- Gaboriau-Routhiau, V., Raibaud, P., Dubuquoy, C., and Moreau, M.C. (2003). Colonization of gnotobiotic mice with human gut microflora at birth protects against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin-mediated abrogation of oral tolerance. *Pediatric research* 54, 739-746.

- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., *et al.* (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* *31*, 677-689.
- Gan, L., Chen, S., and Jensen, G.J. (2008). Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 18953-18957.
- Garcia Vilela, E., De Lourdes De Abreu Ferrari, M., Oswaldo Da Gama Torres, H., Guerra Pinto, A., Carolina Carneiro Aguirre, A., Paiva Martins, F., Marcos Andrade Goulart, E., and Sales Da Cunha, A. (2008). Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scandinavian journal of gastroenterology* *43*, 842-848.
- Garrett, W.S., Lord, G.M., Punit, S., Lugo-Villarino, G., Mazmanian, S.K., Ito, S., Glickman, J.N., and Glimcher, L.H. (2007). Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* *131*, 33-45.
- 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*, 96-99.
- Gaudier, E., Michel, C., Segain, J.P., Cherbut, C., and Hoebler, C. (2005). The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. *The Journal of nutrition* *135*, 2753-2761.
- Gelius, E., Persson, C., Karlsson, J., and Steiner, H. (2003). A mammalian peptidoglycan recognition protein with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. *Biochemical and biophysical research communications* *306*, 988-994.
- Gibson, D.L., Ma, C., Bergstrom, K.S., Huang, J.T., Man, C., and Vallance, B.A. (2008a). MyD88 signalling plays a critical role in host defence by controlling pathogen burden and promoting epithelial cell homeostasis during *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Cellular microbiology* *10*, 618-631.
- Gibson, D.L., Ma, C., Rosenberger, C.M., Bergstrom, K.S., Valdez, Y., Huang, J.T., Khan, M.A., and Vallance, B.A. (2008b). Toll-like receptor 2 plays a critical role in maintaining mucosal integrity during *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Cellular microbiology* *10*, 388-403.
- 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*, 1355-1359.
- 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*, 305-309.
- 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*, 1202-1209.
- 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. *Diseases of the colon & rectum* *50*, 2075-2082.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zahringer, U., *et al.* (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* *300*, 1584-1587.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of biological chemistry* *278*, 8869-8872.
- Girardin, S.E., Tournebize, R., Mavris, M., Page, A.L., Li, X., Stark, G.R., Bertin, J., DiStefano, P.S., Yaniv, M., Sansonetti, P.J., *et al.* (2001). CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO reports* *2*, 736-742.
- Girardin, S.E., Travassos, L.H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I.G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., and Mengin-Lecreulx, D. (2003c). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *The Journal of biological chemistry* *278*, 41702-41708.

- Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., and Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Current molecular medicine* 9, 836-850.
- Gosselink, M.P., Schouten, W.R., van Lieshout, L.M., Hop, W.C., Laman, J.D., and Ruseler-van Embden, J.G. (2004). Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Diseases of the colon & rectum* 47, 876-884.
- 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. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 28, 19-25.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., and Testoni, P.A. (2000). *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences* 45, 1462-1464.
- Guslandi, M., Giollo, P., and Testoni, P.A. (2003). A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *European journal of gastroenterology & hepatology* 15, 697-698.
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J.L. (2002). Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *The Journal of biological chemistry* 277, 41701-41705.
- Guy-Grand, D., Cerf-Bensussan, N., Malissen, B., Malassis-Seris, M., Briottet, C., and Vassalli, P. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *The Journal of experimental medicine* 173, 471-481.
- 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, 427-436.
- 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, 637-649.
- 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. *The Journal of experimental medicine* 205, 2483-2490.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., *et al.* (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics* 39, 207-211.
- Hart, A.L., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., Campieri, M., Kamm, M.A., Knight, S.C., and Stagg, A.J. (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 53, 1602-1609.
- 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. *The Journal of immunology* 169, 4088-4093.
- Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Aoyama, K., Tamura, T., and Suda, Y. (2006). Lipoprotein is a predominant Toll-like receptor 2 ligand in *Staphylococcus aureus* cell wall components. *International immunology* 18, 355-362.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.
- Hayashi, H., Araki, Y., and Ito, E. (1973). Occurrence of glucosamine residues with free amino groups in cell wall peptidoglycan from bacilli as a factor responsible for resistance to lysozyme. *The Journal of bacteriology* 113, 592-598.
- Hayashi, H., Sakamoto, M., and Benno, Y. (2002). Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiology and immunology* 46, 535-548.
- Hayhurst, E.J., Kailas, L., Hobbs, J.K., and Foster, S.J. (2008). Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14603-14608.

- He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., *et al.* (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* *26*, 812-826.
- Hedl, M., and Abraham, C. (2011). Secretory mediators regulate Nod2-induced tolerance in human macrophages. *Gastroenterology* *140*, 231-241.
- Hedl, M., Li, J., Cho, J.H., and Abraham, C. (2007). Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 19440-19445.
- 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*, 1526-1529.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *The Journal of immunology* *167*, 741-748.
- Herskovits, A.A., Auerbuch, V., and Portnoy, D.A. (2007). Bacterial ligands generated in a phagosome are targets of the cytosolic innate immune system. *PLoS pathogens* *3*, e51.
- 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.
- Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2006). Supernatant of Bifidobacterium breve induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *The Journal of allergy and clinical immunology* *117*, 696-702.
- Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquín, C., Velge-Roussel, F., and Lebranchu, Y. (2008). Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS one* *3*, e2753.
- Hocker, M., and Wiedenmann, B. (1998). Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* *859*, 160-174.
- Hoermannsperger, G., Clavel, T., Hoffmann, M., Reiff, C., Kelly, D., Loh, G., Blaut, M., Holzlwimmer, G., Laschinger, M., and Haller, D. (2009). Post-translational inhibition of IP-10 secretion in IEC by probiotic bacteria: impact on chronic inflammation. *PLoS one* *4*, e4365.
- 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 microbiology ecology* *39*, 33-39.
- Holtta, V., Klemetti, P., Sipponen, T., Westerholm-Ormio, M., Kociubinski, G., Salo, H., Rasanen, L., Kolho, K.L., Farkkila, M., Savilahti, E., *et al.* (2008). IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* *14*, 1175-1184.
- Hovhannisyan, Z., Treatman, J., Littman, D.R., and Mayer, L. (2011). Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* *140*, 957-965.
- Hsu, L.C., Ali, S.R., McGillivray, S., Tseng, P.H., Mariathasan, S., Humke, E.W., Eckmann, L., Powell, J.J., Nizet, V., Dixit, V.M., and Karin, M. (2008). A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 7803-7808.
- Huang, F.P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., and MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* *191*, 435-444.
- Inamura, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Shiokawa, Z., Woelk, E., Heine, H., Lindner, B., Inohara, N., Kusumoto, S., and Fukase, K. (2006). Synthesis of peptidoglycan fragments and evaluation of their biological activity. *Organic & biomolecular chemistry* *4*, 232-242.

- Ingrassia, I., Leplingard, A., and Darfeuille-Michaud, A. (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and environmental microbiology* 71, 2880-2887.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., *et al.* (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *The Journal of biological chemistry* 274, 14560-14567.
- Inohara, N., and Nunez, G. (2001). The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 20, 6473-6481.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., *et al.* (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry* 278, 5509-5512.
- Ishikawa, H., Akedo, I., Umesaki, Y., Tanaka, R., Imaoka, A., and Otani, T. (2003). Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *Journal of the american college of nutrition* 22, 56-63.
- 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. *Clinical and experimental immunology* 153, 127-135.
- Ismair, M.G., Vavricka, S.R., Kullak-Ublick, G.A., Fried, M., Mengin-Lecreux, D., and Girardin, S.E. (2006). hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84, 1313-1319.
- Ivanov, I., 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, 337-349.
- Iwasaki, A., and Kelsall, B.L. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *The Journal of experimental medicine* 190, 229-239.
- Iwasaki, A., and Kelsall, B.L. (2001). Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *The Journal of immunology* 166, 4884-4890.
- Iyer, J.K., Khurana, T., Langer, M., West, C.M., Ballard, J.D., Metcalf, J.P., Merkel, T.J., and Coggeshall, K.M. (2010). Inflammatory cytokine response to *Bacillus anthracis* peptidoglycan requires phagocytosis and lysosomal trafficking. *Infection and immunity* 78, 2418-2428.
- Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J.L., Berg, P.L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., *et al.* (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of experimental medicine* 205, 2139-2149.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.
- Jang, M.H., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Ebisuno, Y., Yang, B.G., *et al.* (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *The Journal of immunology* 176, 803-810.
- Jijon, H., Backer, J., Diaz, H., Yeung, H., Thiel, D., McKaigney, C., De Simone, C., and Madsen, K. (2004). DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 126, 1358-1373.
- 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, 1071-1082.
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Forster, R., and Agace, W.W. (2005). Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *The Journal of experimental medicine* 202, 1063-1073.
- Johansson, C., and Kelsall, B.L. (2005). Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Seminars in immunology* 17, 284-294.

- 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, 873-884.
- Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Whitfield, J., Franchi, L., Taraporewala, Z.F., Miller, D., Patton, J.T., Inohara, N., and Núñez, G. (2006). Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *The Journal of biochemical chemistry* 281, 36560-36568.
- Kanneganti, T.D., Lamkanfi, M., and Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 27, 549-559.
- Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews immunology* 3, 984-993.
- Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Makivuokko, H., Rinttila, T., Paulin, L., Corander, J., Malinen, E., Apajalahti, J., and Palva, A. (2007). The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 133, 24-33.
- Katakura, K., Lee, J., Rachmilewitz, D., Li, G., Eckmann, L., and Raz, E. (2005). Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *The Journal of clinical investigation* 115, 695-702.
- Kato, K., Mizuno, S., Umesaki, Y., Ishii, Y., Sugitani, M., Imaoka, A., Otsuka, M., Hasunuma, O., Kurihara, R., Iwasaki, A., and Arakawa, Y. (2004). Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 20, 1133-1141.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature reviews immunology* 5, 373-384.
- Kelly, D., Conway, S., and Aminov, R. (2005). Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends in immunology* 26, 326-333.
- Kelsall, B.L., and Leon, F. (2005). Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunological reviews* 206, 132-148.
- Keshav, S. (2006). Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *Journal of leukocyte biology* 80, 500-508.
- 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, 731-734.
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M.T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., *et al.* (2008). IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57, 1682-1689.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., *et al.* (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19474-19479.
- Kostadinova, F.I., Baba, T., Ishida, Y., Kondo, T., Popivanova, B.K., and Mukaida, N. (2010). Crucial involvement of the CX3CR1-CX3CL1 axis in dextran sulfate sodium-mediated acute colitis in mice. *Journal of leukocyte biology* 88, 133-143.
- Kufer, T.A., Kremmer, E., Adam, A.C., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2008). The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cellular microbiology* 10, 477-486.
- Kufer, T.A., Kremmer, E., Banks, D.J., and Philpott, D.J. (2006). Role for erbin in bacterial activation of Nod2. *Infection and immunity* 74, 3115-3124.
- Kuhbacher, T., Ott, S.J., Helwig, U., Mimura, T., Rizzello, F., Kleessen, B., Gionchetti, P., Blaut, M., Campieri, M., Folsch, U.R., *et al.* (2006). Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut* 55, 833-841.
- Kuisma, J., Mentula, S., Jarvinen, H., Kahri, A., Saxelin, M., and Farkkila, M. (2003). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 17, 509-515.

- Kullberg, B.J., Ferwerda, G., de Jong, D.J., Drenth, J.P., Joosten, L.A., Van der Meer, J.W., and Netea, M.G. (2008). Crohn's disease patients homozygous for the 3020insC NOD2 mutation have a defective NOD2/TLR4 cross-tolerance to intestinal stimuli. *Immunology* 123, 600-605.
- Kullberg, M.C., Andersen, J.F., Gorelick, P.L., Caspar, P., Suerbaum, S., Fox, J.G., Cheever, A.W., Jankovic, D., and Sher, A. (2003). Induction of colitis by a CD4+ T cell clone specific for a bacterial epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15830-15835.
- 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. *The EMBO journal* 26, 4457-4466.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *The Biochemical journal* 420, 1-16.
- Kwon, H.K., Lee, C.G., So, J.S., Chae, C.S., Hwang, J.S., Sahoo, A., Nam, J.H., Rhee, J.H., Hwang, K.C., and Im, S.H. (2010). Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2159-2164.
- Laake, K.O., Bjørneklett, A., Aamodt, G., Aabakken, L., Jacobsen, M., Bakka, A., and Vatn, M.H. (2005). Outcome of four weeks' intervention with probiotics on symptoms and endoscopic appearance after surgical reconstruction with a J-configured ileal-pouch-anal-anastomosis in ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 40, 43-51.
- Lam, E.K., Yu, L., Wong, H.P., Wu, W.K., Shin, V.Y., Tai, E.K., So, W.H., Woo, P.C., and Cho, C.H. (2007). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. *European journal of pharmacology* 565, 171-179.
- Lammers, K.M., Vergopoulos, A., Babel, N., Gionchetti, P., Rizzello, F., Morselli, C., Caramelli, E., Fiorentino, M., d'Errico, A., Volk, H.D., *et al.* (2005). Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression. *Inflammatory bowel diseases* 11, 447-454.
- Langer, M., Malykhin, A., Maeda, K., Chakrabarty, K., Williamson, K.S., Feasley, C.L., West, C.M., Metcalf, J.P., and Coggeshall, K.M. (2008). *Bacillus anthracis* peptidoglycan stimulates an inflammatory response in monocytes through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *PLoS one* 3, e3706.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature reviews microbiology* 8, 171-184.
- Lecine, P., Esmiol, S., Metais, J.Y., Nicoletti, C., Nourry, C., McDonald, C., Nunez, G., Hugot, J.P., Borg, J.P., and Ollendorff, V. (2007). The NOD2-RICK complex signals from the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 282, 15197-15207.
- Lee, H.S., Han, S.Y., Bae, E.A., Huh, C.S., Ahn, Y.T., Lee, J.H., and Kim, D.H. (2008). Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *International immunopharmacology* 8, 574-580.
- Lee, J., Mo, J.H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.T., Lee, H.K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., *et al.* (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nature cell biology* 8, 1327-1336.
- Lee, J., Tattoli, I., Wojtal, K.A., Vavricka, S.R., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2009). pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling. *The Journal of biological chemistry* 284, 23818-23829.
- Lenz, L.L., Mohammadi, S., Geissler, A., and Portnoy, D.A. (2003). SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12432-12437.
- Levri, K.M., Ketvertis, K., Deramo, M., Merenstein, J.H., and D'Amico, F. (2005). Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *The Journal of family practice* 54, 613-620.
- Li, H., Nooh, M.M., Kotb, M., and Re, F. (2008). Commercial peptidoglycan preparations are contaminated with superantigen-like activity that stimulates IL-17 production. *Journal of leukocyte biology* 83, 409-418.

- Li, X., Wang, S., Wang, H., and Gupta, D. (2006). Differential expression of peptidoglycan recognition protein 2 in the skin and liver requires different transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 281, 20738-20748.
- Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., and O'Neill, L.A. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature reviews immunology* 5, 446-458.
- Lin, H.Y., Tang, C.H., Chen, Y.H., Wei, I.H., Chen, J.H., Lai, C.H., and Lu, D.Y. (2010). Peptidoglycan enhances proinflammatory cytokine expression through the TLR2 receptor, MyD88, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and NF-kappaB pathways in BV-2 microglia. *International immunopharmacology* 10, 883-891.
- Lipinski, S., Till, A., Sina, C., Art, A., Grasberger, H., Schreiber, S., and Rosenstiel, P. (2009). DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses. *Journal of cell science* 122, 3522-3530.
- 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, 379-381.
- 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. *Inflammatory bowel diseases* 15, 275-283.
- Lo, D., Tynan, W., Dickerson, J., Mendy, J., Chang, H.W., Scharf, M., Byrne, D., Brayden, D., Higgins, L., Evans, C., *et al.* (2003). Peptidoglycan recognition protein expression in mouse Peyer's Patch follicle associated epithelium suggests functional specialization. *Cellular immunology* 224, 8-16.
- Lu, X., Wang, M., Qi, J., Wang, H., Li, X., Gupta, D., and Dziarski, R. (2006). Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *The Journal of biological chemistry* 281, 5895-5907.
- Luhrs, H., Kudlich, T., Neumann, M., Schaubert, J., Melcher, R., Gostner, A., Scheppach, W., and Menzel, T.P. (2002). Butyrate-enhanced TNFalpha-induced apoptosis is associated with inhibition of NF-kappaB. *Anticancer research* 22, 1561-1568.
- Ma, D., Forsythe, P., and Bienenstock, J. (2004). Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infection and immunity* 72, 5308-5314.
- MacDonald, T.T., and Monteleone, G. (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307, 1920-1925.
- Macho Fernandez, E., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I.B., and Grangette, C. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*. 2011 April 6. [Epub ahead of print]
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M.A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827-833.
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *The American journal of physiology* 276, G941-950.
- Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews immunology* 4, 478-485.
- Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1029, 36-43.
- Maeda, S., Hsu, L.C., Liu, H., Bankston, L.A., Iimura, M., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., and Karin, M. (2005). Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307, 734-738.
- Magalhaes, J.G., Fritz, J.H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Travassos, L.H., Selvanantham, T., Girardin, S.E., Gommerman, J.L., and Philpott, D.J. (2008). Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *The Journal of immunology* 181, 7925-7935.
- Magalhaes, J.G., Philpott, D.J., Nahori, M.A., Jehanno, M., Fritz, J., Le Bourhis, L., Viala, J., Hugot, J.P., Giovannini, M., Bertin, J., *et al.* (2005). Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO reports* 6, 1201-1207.

- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A., and De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in microbiology* *157*, 241-247.
- Malchow, H.A. (1997). Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *Journal of clinical gastroenterology* *25*, 653-658.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 1966-1971.
- Mancuso, G., Gambuzza, M., Midiri, A., Biondo, C., Papasergi, S., Akira, S., Teti, G., and Beninati, C. (2009). Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nature immunology* *10*, 587-594.
- 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*, 228-232.
- Marina-Garcia, N., Franchi, L., Kim, Y.G., Hu, Y., Smith, D.E., Boons, G.J., and Nunez, G. (2009). Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *The Journal of immunology* *182*, 4321-4327.
- Marteau, P. (2009). Bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases* *27 Suppl 1*, 99-103.
- Marteau, P. (2010). Probiotics in functional intestinal disorders and IBS: proof of action and dissecting the multiple mechanisms. *Gut* *59*, 285-286.
- Martens, E.C., Chiang, H.C., and Gordon, J.I. (2008). Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell host & microbe* *4*, 447-457.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* *10*, 417-426.
- Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E., and Tschopp, J. (2004). Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Current Biology* *14*, 1929-1934.
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* *440*, 237-241.
- Massacand, J.C., Kaiser, P., Ernst, B., Tardivel, A., Burki, K., Schneider, P., and Harris, N.L. (2008). Intestinal bacteria condition dendritic cells to promote IgA production. *PloS one* *3*, e2588.
- Matsumoto, S., Hara, T., Nagaoka, M., Mike, A., Mitsuyama, K., Sako, T., Yamamoto, M., Kado, S., and Takada, T. (2009). A component of polysaccharide peptidoglycan complex on *Lactobacillus* induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Immunology* *128*, e170-180.
- Matto, J., Malinen, E., Suihko, M.L., Alander, M., Palva, A., and Saarela, M. (2004). Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of applied microbiology* *97*, 459-470.
- 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*, 107-118.
- McDonald, C., Chen, F.F., Ollendorff, V., Ogura, Y., Marchetto, S., Lecine, P., Borg, J.P., and Nunez, G. (2005). A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling. *The Journal of biological chemistry* *280*, 40301-40309.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* *449*, 819-826.
- 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*, 821-828.
- Merlin, D., Si-Tahar, M., Sitaraman, S.V., Eastburn, K., Williams, I., Liu, X., Hediger, M.A., and Madara, J.L. (2001). Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. *Gastroenterology* *120*, 1666-1679.

- Merlin, D., Steel, A., Gewirtz, A.T., Si-Tahar, M., Hediger, M.A., and Madara, J.L. (1998). hPepT1-mediated epithelial transport of bacteria-derived chemotactic peptides enhances neutrophil-epithelial interactions. *The Journal of clinical investigation* 102, 2011-2018.
- Meroueh, S.O., Bencze, K.Z., Hessek, D., Lee, M., Fisher, J.F., Stemmler, T.L., and Mobashery, S. (2006). Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4404-4409.
- Miao, E.A., Alpujch-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I., and Aderem, A. (2006). *Nature immunology* 7, 549-551.
- 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, 108-114.
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W.V., Ruthel, G., Demmin, G.L., Warfield, K.L., Bavari, S., and Klaenhammer, T.R. (2005). Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2880-2885.
- Molofsky, A.B., Byrne, B.G., Whitfield, N.N., Madigan, C.A., FUSE, E.T., Tateda, K., and Swanson, M.S. (2006). *The Journal of experimental medicine* 203, 1093-10104.
- Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K.L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., *et al.* (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 314, 1157-1160.
- Moreira, L.O., El Kasmi, K.C., Smith, A.M., Finkelstein, D., Fillon, S., Kim, Y.G., Nunez, G., Tuomanen, E., and Murray, P.J. (2008). The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. *Cellular microbiology* 10, 2067-2077.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews immunology* 3, 331-341.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317, 256-260.
- Mukherjee, S., Vaishnava, S., and Hooper, L.V. (2008). Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cellular and molecular life sciences* 65, 3019-3027.
- Muller-Anstett, M.A., Muller, P., Albrecht, T., Nega, M., Wagener, J., Gao, Q., Kaesler, S., Schaller, M., Biedermann, T., and Gotz, F. (2010). Staphylococcal peptidoglycan co-localizes with Nod2 and TLR2 and activates innate immune response via both receptors in primary murine keratinocytes. *PloS one* 5, e13153.
- Murphey, E.D., Fang, G., and Sherwood, E.R. (2008). Pretreatment with the Gram-positive bacterial cell wall molecule peptidoglycan improves bacterial clearance and decreases inflammation and mortality in mice challenged with *Staphylococcus aureus*. *Critical care medicine* 36, 3067-3073.
- Murphey, E.D., and Sherwood, E.R. (2008). Pretreatment with the Gram-positive bacterial cell wall molecule peptidoglycan improves bacterial clearance and decreases inflammation and mortality in mice challenged with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 10, 1244-1250.
- Netea, M.G., Kullberg, B.J., de Jong, D.J., Franke, B., Sprong, T., Naber, T.H., Drenth, J.P., and Van der Meer, J.W. (2004). NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *European journal of immunology* 34, 2052-2059.
- Neutra, M.R., Frey, A., and Kraehenbuhl, J.P. (1996). Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86, 345-348.
- Niess, J.H., and Adler, G. (2010). Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. *The Journal of immunology* 184, 2026-2037.
- Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., *et al.* (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258.

- 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. *The Journal of immunology* 180, 559-568.
- Nigro, G., Fazio, L.L., Martino, M.C., Rossi, G., Tattoli, I., Liparoti, V., De Castro, C., Molinaro, A., Philpott, D.J., and Bernardini, M.L. (2008). Muramylpeptide shedding modulates cell sensing of *Shigella flexneri*. *Cellular microbiology* 10, 682-695.
- Noguchi, E., Homma, Y., Kang, X., Netea, M.G., and Ma, X. (2009). A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nature Immunology* 10, 471-479.
- Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2007). Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* 56, 1240-1247.
- O'Connor, W., Jr., Kamanaka, M., Booth, C.J., Town, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Kolls, J.K., and Flavell, R.A. (2009). A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nature immunology* 10, 603-609.
- O'Hara, A.M., O'Regan, P., Fanning, A., O'Mahony, C., Macsharry, J., Lyons, A., Bienenstock, J., O'Mahony, L., and Shanahan, F. (2006). Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 118, 202-215.
- O'Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 7, 688-693.
- O'Neill, L.A., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology* 7, 353-364.
- Ogihara, H., Saito, H., Shin, B.C., Terado, T., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Inui, K., and Takata, K. (1996). Immuno-localization of H<sup>+</sup>/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochemical and biophysical research communications* 220, 848-852.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., *et al.* (2001a). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603-606.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001b). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry* 276, 4812-4818.
- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T.A., Chen, F.F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J.H., Hart, J., *et al.* (2003). Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52, 1591-1597.
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A.C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R.R., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2004). Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of biological chemistry* 279, 36426-36432.
- 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, 1054-1070.
- Otte, J.M., and Podolsky, D.K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *American journal of physiology* 286, G613-626.
- Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454-467.
- Parassol, N., Freitas, M., Thoreux, K., Dalmasso, G., Bourdet-Sicard, R., and Rampal, P. (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Research in microbiology* 156, 256-262.
- 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, 1191-1195.
- Pauleau, A.L., and Murray, P.J. (2003). Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Molecular and cellular biology* 23, 7531-7539.

- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death & differentiation* *14*, 1583-1589.
- Pink, D., Moeller, J., Quinn, B., Jericho, M., and Beveridge, T. (2000). On the architecture of the gram-negative bacterial murein sacculus. *The Journal of bacteriology* *182*, 5925-5930.
- Pochard, P., Hammad, H., Ratajczak, C., Charbonnier-Hatzfeld, A.S., Just, N., Tonnel, A.B., and Pestel, J. (2005). Direct regulatory immune activity of lactic acid bacteria on Der p 1-pulsed dendritic cells from allergic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* *116*, 198-204.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* *282*, 2085-2088.
- Powrie, F., Read, S., Mottet, C., Uhlig, H., and Maloy, K. (2003). Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Foundation symposium* *252*, 92-98; discussion 98-105, 106-114.
- Prantera, C., Scribano, M.L., Falasco, G., Andreoli, A., and Luzi, C. (2002). Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG. *Gut* *51*, 405-409.
- Prescott, N.J., Fisher, S.A., Franke, A., Hampe, J., Onnie, C.M., Soars, D., Bagnall, R., Mirza, M.M., Sanderson, J., Forbes, A., *et al.* (2007). A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* *132*, 1665-1671.
- Pronio, A., Montesani, C., Butteroni, C., Vecchione, S., Mumolo, G., Vestri, A., Vitolo, D., and Boirivant, M. (2008). Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells. *Inflammatory bowel diseases* *14*, 662-668.
- Pulendran, B., Tang, H., and Denning, T.L. (2008). Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Current opinion in immunology* *20*, 61-67.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., *et al.* (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* *126*, 520-528.
- Rakoff-Nahoum, S., Hao, L., and Medzhitov, R. (2006). Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* *25*, 319-329.
- Rehman, A., Lepage, P., Nolte, A., Hellmig, S., Schreiber, S., and Ott, S.J. (2010). Transcriptional activity of the dominant gut mucosal microbiota in chronic inflammatory bowel disease patients. *Journal of medical microbiology* *59*, 1114-1122.
- Reid, G., Sanders, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C., and Klaenhammer, T.R. (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology* *37*, 105-118.
- Rembacken, B.J., Snelling, A.M., Hawkey, P.M., Chalmers, D.M., and Axon, A.T. (1999). Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* *354*, 635-639.
- Ren, T., Zamboni, D.S., Roy, C.R., Dietrich, W.F., and Vance, R.E. (2006). *PLoS pathogens* *2*, e18.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology* *2*, 361-367.
- Rescigno, M., and Di Sabatino, A. (2009). Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of clinical investigation* *119*, 2441-2450.
- 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. *Nature immunology* *6*, 507-514.
- Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., *et al.* (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics* *39*, 596-604.

- Rochet, V., Rigottier-Gois, L., Ledaire, A., Andrieux, C., Sutren, M., Rabot, S., Mogenet, A., Bresson, J.L., Cools, S., Picard, C., *et al.* (2008a). Survival of *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 in the faecal microbiota after administration in lyophilised form or in fermented product - a randomised study in healthy adults. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* *14*, 128-136.
- Rochet, V., Rigottier-Gois, L., Levenez, F., Cadiou, J., Marteau, P., Bresson, J.L., Goupil-Feillerat, N., and Dore, J. (2008b). Modulation of *Lactobacillus casei* in ileal and fecal samples from healthy volunteers after consumption of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114 001Rif. *Canadian journal of microbiology* *54*, 660-667.
- Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2010). Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 12204-12209.
- Round, J.L., O'Connell, R.M., and Mazmanian, S.K. (2010). Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. *Journal of autoimmunity* *34*, J220-225.
- Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., Dubuquoy, C., Merour, E., Geboes, K., Chamailard, M., *et al.* (2007). *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nature medicine* *13*, 35-37.
- Royet, J., and Dziarski, R. (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nature reviews microbiology* *5*, 264-277.
- Ruprecht, C.R., and Lanzavecchia, A. (2006). Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *European journal of immunology* *36*, 810-816.
- Sabbah, A., Chang, T.H., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P.H., Xiang, Y., and Bose, S. (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nature immunology* *10*, 1073-1080.
- Salazar-Gonzalez, R.M., Niess, J.H., Zammit, D.J., Ravindran, R., Srinivasan, A., Maxwell, J.R., Stoklasek, T., Yadav, R., Williams, I.R., Gu, X., *et al.* (2006). CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* *24*, 623-632.
- Salzman, N.H., Underwood, M.A., and Bevins, C.L. (2007). Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in immunology* *19*, 70-83.
- Sartor, R.B. (1997). The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Research in immunology* *148*, 567-576.
- Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice* *3*, 390-407.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* *134*, 577-594.
- Sashihara, T., Sueki, N., and Ikegami, S. (2006). An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *Journal of dairy science* *89*, 2846-2855.
- Sato, A., Hashiguchi, M., Toda, E., Iwasaki, A., Hachimura, S., and Kaminogawa, S. (2003). CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *The Journal of immunology* *171*, 3684-3690.
- Scheffers, D.J., and Pinho, M.G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and molecular biology reviews* *69*, 585-607.
- Schlee, M., Harder, J., Koten, B., Stange, E.F., Wehkamp, J., and Fellermann, K. (2008). Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clinical and experimental immunology* *151*, 528-535.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., and Fellermann, K. (2007). Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and immunity* *75*, 2399-2407.
- Schultz, M., Timmer, A., Herfarth, H.H., Sartor, R.B., Vanderhoof, J.A., and Rath, H.C. (2004). *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC gastroenterology* *4*, 5.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *The Journal of experimental medicine* *206*, 3101-3114.

- 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. *The Journal of biological chemistry* 274, 17406-17409.
- Segain, J.P., Raingeard de la Bletiere, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H.M., and Galmiche, J.P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 47, 397-403.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., and Dore, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237-242.
- 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. *Infection and immunity* 66, 5224-5231.
- Sharma, M.D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D.Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B.R., Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of clinical investigation* 117, 2570-2582.
- Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S., Goulet, J., and Tompkins, T.A. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and immunity* 73, 5183-5188.
- Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Watanabe, K., and Nanno, M. (2006). Induction of interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. *Journal of dairy science* 89, 3306-3317.
- Shih, D.Q., and Targan, S.R. (2008). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 14, 390-400.
- Shimada, K., Chen, S., Dempsey, P.W., Sorrentino, R., Alsabeh, R., Slepkin, A.V., Peterson, E., Doherty, T.M., Underhill, D., Crother, T.R., *et al.* (2009). The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydomytila pneumoniae* lung infection. *PLoS pathogens* 5, e1000379.
- Shroff, K.E., and Cebra, J.J. (1995). Development of mucosal humoral immune responses in germ-free (GF) mice. *Advances in experimental medicine and biology* 371A, 441-446.
- 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. *Seminars in immunology* 19, 59-69.
- Smits, H.H., Engering, A., van der Kleij, D., de Jong, E.C., Schipper, K., van Capel, T.M., Zaat, B.A., Yazdanbakhsh, M., Wierenga, E.A., van Kooyk, Y., *et al.* (2005). Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *The Journal of allergy and clinical immunology* 115, 1260-1267.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., *et al.* (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16731-16736.
- Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I., Marteau, P., and Dore, J. (2006). Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 12, 106-111.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., and Dore, J. (2009). Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases* 15, 1183-1189.
- 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, 1955-1959.
- Soo, I., Madsen, K.L., Tejpar, Q., Sydora, B.C., Sherbaniuk, R., Cinque, B., Di Marzio, L., Cifone, M.G., Desimone, C., and Fedorak, R.N. (2008). VSL#3 probiotic upregulates intestinal mucosal alkaline sphingomyelinase and reduces inflammation. *The Canadian journal of gastroenterology* 22, 237-242.

- Spanhaak, S., Havenaar, R., and Schaafsma, G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European journal of clinical nutrition* *52*, 899-907.
- Spor, A., Koren, O., and Ley, R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature reviews microbiology* *9*, 279-290.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P.B., and Ross, R.P. (2001). Market potential for probiotics. *The American journal of clinical nutrition* *73*, 476S-483S.
- 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. *The Journal of immunology* *180*, 2588-2599.
- Steinman, L. (2008). A rush to judgment on Th17. *The Journal of experimental medicine* *205*, 1517-1522.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature reviews immunology* *6*, 9-20.
- Strober, W., Fuss, I., and Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation* *117*, 514-521.
- Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* *204*, 1775-1785.
- Sutterwala, F.S., Mijares, L.A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B.I., and Flavell, R.A. (2007). *The Journal of experimental medicine* *204*, 3235-3245.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Engelhardt, H., Bengmark, S., Koch, S., Lochs, H., and Dorffel, Y. (2007). Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* *56*, 343-350.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* *140*, 805-820.
- Tamboli, C.P., Neut, C., Desreumaux, P., and Colombel, J.F. (2004). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* *53*, 1-4.
- Tanabe, S., Kinuta, Y., and Saito, Y. (2008). *Bifidobacterium infantis* suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. *International journal of molecular medicine* *22*, 181-185.
- Tattoli, I., Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Magalhaes, J.G., and Girardin, S.E. (2007). The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Seminars in immunopathology* *29*, 289-301.
- Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T. (2007). Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* *448*, 929-933.
- 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. *The Journal of immunology* *176*, 1228-1237.
- Torok, H.P., Glas, J., Tonenchi, L., Mussack, T., and Folwaczny, C. (2004). Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clinical immunology* *112*, 85-91.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.G., Magalhaes, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., *et al.* (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature immunology* *11*, 55-62.
- Travassos, L.H., Girardin, S.E., Philpott, D.J., Blanot, D., Nahori, M.A., Werts, C., and Boneca, I.G. (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO reports* *5*, 1000-1006.
- Tursi, A., Brandimarte, G., Giorgetti, G.M., Forti, G., Modeo, M.E., and Gigliobianco, A. (2004). Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Medical science monitor* *10*, 126-131.

- Tydell, C.C., Yount, N., Tran, D., Yuan, J., and Selsted, M.E. (2002). Isolation, characterization, and antimicrobial properties of bovine oligosaccharide-binding protein. A microbicidal granule protein of eosinophils and neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 277, 19658-19664.
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.G., Jung, Y.J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., *et al.* (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature immunology* 9, 769-776.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D., and Aderem, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14459-14463.
- van Beelen, A.J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E.W., Muller, F.J., Hommes, D.W., Zaat, S.A., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. (2007). Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 27, 660-669.
- Van Gossum, A., Dewit, O., Louis, E., de Hertogh, G., Baert, F., Fontaine, F., DeVos, M., Enslin, M., Paintin, M., and Franchimont, D. (2007). Multicenter randomized-controlled clinical trial of probiotics (*Lactobacillus johnsonii*, LA1) on early endoscopic recurrence of Crohn's disease after ileo-caecal resection. *Inflammatory bowel diseases* 13, 135-142.
- van Heel, D.A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K.A., Lundberg, A.M., Ahmad, T., McGovern, D.P., Onnie, C., Negoro, K., Goldthorpe, S., *et al.* (2005). Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* 365, 1794-1796.
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-512.
- Varol, C., Zigmund, E., and Jung, S. (2010). Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nature reviews immunology* 10, 415-426.
- Vavricka, S.R., Musch, M.W., Chang, J.E., Nakagawa, Y., Phanvijhitsiri, K., Waypa, T.S., Merlin, D., Schneewind, O., and Chang, E.B. (2004). hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 127, 1401-1409.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., and Gewirtz, A.T. (2008). Toll like receptor-5: protecting the gut from enteric microbes. *Seminars in immunopathology* 30, 11-21.
- 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., *et al.* (2007). Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *The Journal of clinical investigation* 117, 3909-3921.
- Volz, T., Nega, M., Buschmann, J., Kaesler, S., Guenova, E., Peschel, A., Rocken, M., Gotz, F., and Biedermann, T. (2010). Natural *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate immune system exclusively in the presence of TLR signals. *The FASEB journal* 24, 4089-4102.
- Voo, K.S., Wang, Y.H., Santori, F.R., Boggiano, C., Wang, Y.H., Arima, K., Bover, L., Hanabuchi, S., Khalili, J., Marinova, E., *et al.* (2009). Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 4793-4798.
- 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.
- Wang, H., Gupta, D., Li, X., and Dziarski, R. (2005). Peptidoglycan recognition protein 2 (N-acetylmuramoyl-L-Ala amidase) is induced in keratinocytes by bacteria through the p38 kinase pathway. *Infection and immunity* 73, 7216-7225.
- Wang, M., Liu, L.H., Wang, S., Li, X., Lu, X., Gupta, D., and Dziarski, R. (2007). Human peptidoglycan recognition proteins require zinc to kill both gram-positive and gram-negative bacteria and are synergistic with antibacterial peptides. *The Journal of immunology* 178, 3116-3125.
- Wang, Z.M., Li, X., Cocklin, R.R., Wang, M., Wang, M., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Gupta, D., and Dziarski, R. (2003). Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *The Journal of biological chemistry* 278, 49044-49052.

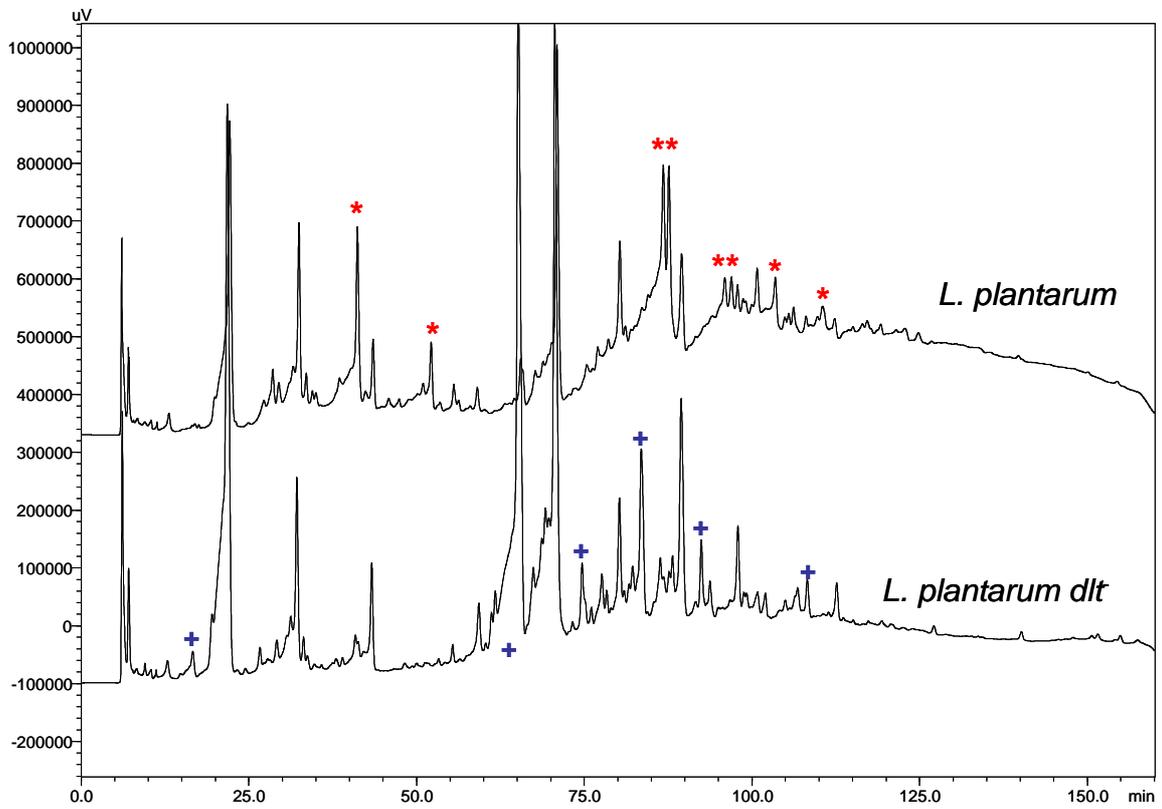
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J., Wakatsuki, Y., Fuss, I.J., and Strober, W. (2006). Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity* 25, 473-485.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., *et al.* (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658-1664.
- Werts, C., le Bourhis, L., Liu, J., Magalhaes, J.G., Carneiro, L.A., Fritz, J.H., Stockinger, S., Balloy, V., Chignard, M., Decker, T., *et al.* (2007). Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway. *European journal of immunology* 37, 2499-2508.
- 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., *et al.* (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature immunology* 2, 346-352.
- Windheim, M., Lang, C., Peggie, M., Plater, L.A., and Cohen, P. (2007). Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *The Biochemical journal* 404, 179-190.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 519-527.
- Xu, J., and Gordon, J.I. (2003). Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10452-10459.
- Yamano, T., Iino, H., Takada, M., Blum, S., Rochat, F., and Fukushima, Y. (2006). Improvement of the human intestinal flora by ingestion of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. *The British journal of nutrition* 95, 303-312.
- Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Whitehead, R., Washington, M.K., and Polk, D.B. (2007). Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 132, 562-575.
- Yan, F., and Polk, D.B. (2002). Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 50959-50965.
- Yang, Z., Fuss, I.J., Watanabe, T., Asano, N., Davey, M.P., Rosenbaum, J.T., Strober, W., and Kitani, A. (2007). NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction. *Gastroenterology* 133, 1510-1521.
- 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., *et al.* (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.
- Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., *et al.* (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of clinical investigation* 116, 1310-1316.
- Yoshida, M., Claypool, S.M., Wagner, J.S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2004). Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 20, 769-783.
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R., and Golenbock, D. (1999). Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *The Journal of immunology* 163, 1-5.
- Zaph, C., Du, Y., Saenz, S.A., Nair, M.G., Perrigoue, J.G., Taylor, B.C., Troy, A.E., Kobuley, D.E., Kastelein, R.A., Cua, D.J., *et al.* (2008). Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. *The Journal of experimental medicine* 205, 2191-2198.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., and Frokiaer, H. (2008a). Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* 123, 197-208.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., and Frokiaer, H. (2008b). Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology* 124, 489-502.

- 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, 1522-1526.
- 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. *The Journal of nutrition* 135, 1752-1756.
- Zhao, Z., Fux, B., Goodwin, M., Dunay, I.R., Strong, D., Miller, B.C., Cadwell, K., Delgado, M.A., Ponpuak, M., Green, K.G., *et al.* (2008). Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell host & microbe* 4, 458-469.
- Ziegler, T.R., Fernandez-Estivariz, C., Gu, L.H., Bazargan, N., Umeakunne, K., Wallace, T.M., Diaz, E.E., Rosado, K.E., Pascal, R.R., Galloway, J.R., *et al.* (2002). Distribution of the H<sup>+</sup>/peptide transporter PepT1 in human intestine: up-regulated expression in the colonic mucosa of patients with short-bowel syndrome. *The American journal of clinical nutrition* 75, 922-930.
- Zola, T.A., Lysenko, E.S., and Weiser, J.N. (2008). Mucosal clearance of capsule-expressing bacteria requires both TLR and nucleotide-binding oligomerization domain 1 signaling. *The Journal of immunology* 181, 7909-7916.
- Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Dewulf, J., Pot, B., and Grangette, C. (2009). Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *International journal of food microbiology* 131, 40-51.
- Zyrek, A.A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., and Schmidt, M.A. (2007). Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cellular microbiology* 9, 804-816.

# **ANNEXES**

## Annexe 1

Chromatogramme représentant l'analyse de la composition en muuropeptides du peptidoglycane des souches *L. plantarum* sauvage et *L. plantarum dlt*.



\* pic disparaissant chez le mutant *dlt*

+ pic apparaissant chez le mutant *dlt*

## Annexe 2 : Liste des travaux

### Article scientifique

**E. Macho Fernandez**, V. Valenti, C. Rockel, C. Hermann, B. Pot, I. G. Boneca and C. Grangette.

Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*, 2011. *In press*

### Communications posters

6<sup>th</sup> meeting of the European Mucosal Immunology Group (EMIG), October 8-10 2008, Milan.

**E. Macho Fernandez**, V. Peucelle, V. Valenti, I.G. Boneca, C. Herman, B. Pot and C. Grangette

The immunoregulatory properties of probiotics are mediated through PGN/Nod2 signalling.

9<sup>ème</sup> Journée André Verbert, colloque annuel des doctorants de l'Ecole Doctorale Biologie Santé Lille-Nord de France, 16 Septembre 2009, Lille.

**E. Macho Fernandez**, V. Valenti, C. Hermann, I.G. Boneca, B. Pot et C. Grangette.

Rôle du peptidoglycane dans les propriétés immuno-régulatrices des probiotiques : implication de la voie de signalisation NOD2

1st International Danone Research/Institut Pasteur joint symposium - Microbes for Health, November 22-23 2010, Paris.

**E. Macho Fernandez**, V. Valenti, C. Rockel, C. Hermann, B. Pot, I. G. Boneca and C. Grangette.

The strain-specific anti-inflammatory capacities of probiotics are driven by NOD2-mediated recognition of specific muropeptides derived from the peptidoglycan.

### Communications orales

Première journée d'animation scientifique MICALIS-INRA, Interaction micro-organisme, Mai 2007, Jouy-en-Josas.

B. Foligné, **E. Macho Fernandez**, G. Zoumpopoulou, J. Dewulf, A. Ben Younes, F. Barreau, J.C. Sirard, B. Pot et C. Grangette.

Propriétés anti-inflammatoires des probiotiques : Rôle des cellules dendritiques.

15<sup>ème</sup> colloque du Club des Bactéries Lactiques, 13-15 Novembre 2007, Rennes.

B. Foligné, **E. Macho Fernandez**, G. Zoumpopoulou, J. Dewulf, A. Ben Younes, F. Barreau, J.C. Sirard, B. Pot et C. Grangette.

Probiotic-induced regulatory dendritic cells prevent colitis through TLR2 and NOD2 signalling.

Club francophone des cellules dendritiques, 2007, Paris

B. Foligné, **E. Macho Fernandez**, G. Zoumpopoulou, J. Dewulf, A. Ben Younes, F. Barreau, J.C. Sirard, B. Pot et C. Grangette.

Probiotic-induced regulatory dendritic cells prevent colitis through TLR2 and NOD2 signalling.

16<sup>ème</sup> colloque du Club des Bactéries Lactiques, 27-29 Mai 2009, Toulouse.

**E. Macho Fernandez**, V. Peucelle, V. Valenti, I.G. Boneca, C. Herman, B. Pot et C. Grangette.

Rôle du peptidoglycane dans les propriétés immuno-régulatrices des lactobacilles : implication de la voie de signalisation NOD2.

12th Gut Day Symposium, September 23<sup>rd</sup> 2010, Ghent, Belgium.

**E. Macho Fernandez**, V. Valenti, I. G. Boneca, B. Pot and C. Grangette.

The strain-specific anti-inflammatory capacities of probiotics are driven by NOD2-mediated recognition of specific muropeptides derived from the peptidoglycan.