

Analyse des effets de souches probiotiques anti-inflammatoires

Laurie Watterlot

▶ **To cite this version:**

Laurie Watterlot. Analyse des effets de souches probiotiques anti-inflammatoires. Alimentation et Nutrition. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0028 . pastel-00570505

HAL Id: pastel-00570505
https://pastel.hal.science/pastel-00570505

Submitted on 28 Feb 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.

N° /__/__/__/__/__/__/__/__/__/__/

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)

Spécialité : Microbiologie et Biologie Moléculaire

présentée et soutenue publiquement
par

Laurie WATTERLOT

le 29 mars 2010

ANALYSE DES EFFETS DE SOUCHES PROBIOTIQUES ANTI-INFLAMMATOIRES

Directeur de thèse : ***Philippe LANGELLA***

INRA, UR 910 Unité d'écologie et de physiologie du système digestif, F- 78350 Jouy en Josas INRA,

Devant le jury :

M^me^ Marielle BOUIX, Enseignant chercheur**, AGROSPARISTECH**	**Président**
M^me^ Arlette DARFEUILLE-MICHAUD, Directeur de Recherche, **Faculté de Médecine**	**Rapporteur**
M^me^ Hélène BIERNE, Directeur de recherche**, INSTITUT PASTEUR**	**Rapporteur**
M. Jean FIORAMONTI, Chef de département adjoint d'AlimH, **INRA**	**Examinateur**
M. Henri DURAND, Directeur scientifique, **LALLEMAND**	**Examinateur**
M. Philippe LANGELLA, Directeur de recherche, **INRA**	**Examinateur**
M. Luis BERMUDEZ-HUMARAN, Chargé de recherche, **INRA**	**Examinateur**

Je dédie cette thèse à ma fille Loann,

Tu as vu le jour entre deux manips et tu as fais tes premiers pas
pendant que je remplissais les lignes de ce mémoire.
Sache que tu es ma plus belle réussite,
Je t'aime,
Maman.

REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier **Marielle Bouix**, **Arlette Darfeuille-Michaud** et **Hélène Bierne**, d'avoir fait partie de mes comités de thèse, d'avoir accepté de lire et d'évaluer l'ensemble de mon travail et de m'avoir guidée dans la réalisation de cette thèse.*

*Merci à **Jean Fioramonti** et **Henri Durand** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et du temps qu'ils ont passé à l'évaluation de mes travaux.*

Philippe,
Que dire, je suis extrêmement ravie d'avoir passé ces 4 années à tes côtés, les hauts et les bas, les accords et désaccords auront fait je pense la construction de cette thèse. Je suis désolée d'être venue pleurer dans ton bureau tous les 6 mois (heureusement que tous les thésards ne sont pas aussi sensibles que moi sinon tu passerais des heures à distribuer des mouchoirs !!!) Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de découvrir la recherche à tes côtés. Merci d'avoir si bien géré le fait que je devienne maman pendant la thèse et de m'avoir soutenue et guidée dans mes choix aussi bien personnels que professionnels. Je serais chanceuse si mes futurs encadrants s'avèrent être aussi cool que toi…

Claire,
Heureusement que tu étais là pour me former aux manips cellulaires, pour m'aider dans la rédaction de mes articles et de mes rapports en tous genres, cette fois, en ce qui concerne les remerciements tu n'auras pas ton mot à dire ! Mais surtout merci de m'avoir accompagnée dans les hauts et les bas de ma thèse, pour avoir été toujours disponible et à mon écoute, tu as été plus qu'une encadrante, au-delà de l'aspect scientifique, tu m'as aidée à traverser cette épreuve parce que parfois oui, c'était une épreuve ! Tu m'as toujours redonné courage, tu es une bonne conseillère, une excellente encadrante et je suis ravie d'avoir été ta première thésarde. Je pense sincèrement que les prochains sont chanceux de t'avoir à leurs côtés. Alors merci pour tout ça.

Luis,
Merci d'avoir toujours été à mes côtés pour ma thèse, d'avoir monté et descendu tant d'escaliers pour venir à mon secours durant ma première année, de m'avoir tout appris sur la manipulation de nos petites bactéries, de m'avoir donné goût à la recherche scientifique, de m'avoir toujours poussé à aller plus loin dans ce que je désirais. De m'avoir fait découvrir le monde de la biologie moléculaire que tu apprécies tant. Mais de toutes ces années, je retiens surtout ton optimisme à toute épreuve, ta disponibilité envers moi et ta réactivité face à toutes mes demandes. Merci pour tout.

***Pascal et Chantal**, vous allez vraiment beaucoup me manquer, je crois que votre présence à mes côtés y est pour beaucoup dans la réussite de cette thèse. Vous deux, avec qui j'ai partagé presque tous mes repas, mes joies et mes peines !!! Vous m'avez écouté parler, parler et encore parler sans jamais vous plaindre, vous m'avez soutenue dans tous mes choix et je ne vous remercierai jamais assez pour ça. Merci Chantal pour les nombreux allers-retours que tu as faits pour me conduire chez moi alors que mon gros ventre m'empêchait de prendre mon vélo !! Eh au fait n'oubliez pas que la cantine ferme à 13h30 je ne serai bientôt plus là pour vous le rappeler !!! Une pensée toute particulière pour **Sylvie**, qui a rejoint pour mon plus*

grand plaisir notre groupe des « mange-tard », je ne vous oublierai jamais, merci d'avoir été là !

*Un remerciement tout particulier à **Julie, Noura, Leila**, **Aurore, Pascale et Florian**, vous avez rendu ma dernière année de thèse particulièrement plaisante, nos bonnes parties de rigolade entre deux manips ou pour moi entre deux lignes rédigées péniblement…ça a été un réel plaisir de partager cette année à vos côtés, je ne pense pas que j'aurai autant apprécié mon retour au labo sans votre présence. Merci pour m'avoir aidée dans mes choix professionnels, pour avoir corrigé mes CV et autres lettre de motivations avec tant d'entrain, pour m'avoir aidée dans la préparation de mes oraux et d'avoir toujours été à l'écoute, merci de m'avoir fait tant rire et de m'avoir acceptée avec mes défauts et mes qualités, vous êtes tous les six géniaux, je garderai un excellent souvenir des moments qu'on a partagés et j'espère de tout cœur qu'on restera en contact bien après mon départ, vous allez me manquer…*

***Fabien** et **Marie-lise**, je n'oublierai pas les repas amicaux qu'on a partagés, les soirées télés avec Marie-lise et nos grandes discussions avec Fabien, je suis ravie d'avoir partagé ces quelques mois à vos côtés.*

***Anne-Claire**, c'est un réel plaisir de te compter parmi mes amis et de partager avec toi certainement les plus beaux moments de ma vie, je parle bien sur de notre aventure commune (hors thèse) qui a fait de nous des thésardes particulièrement crevées mais heureuses !!!! C'est vraiment génial d'avoir pu vivre cette expérience à tes côtés…*

*Merci à mes compagnons de bureau qui ont été nombreux vu le nombre de déménagements effectués, **Maria**, **Harry**, **Luis**, **Jean-Marc**, **Sébastien** et **Jean-Jacques**, merci de m'avoir supportée, écoutée et aidée notamment en ce qui concerne les nombreux bugs informatiques, Eh oui JJ tu vas retrouver ton téléphone et Seb le calme d'un bureau sans nana !!! Je pense avoir été chanceuse d'avoir pu partager votre quotidien…*

*Merci à mes compagnons de manips souris : **Luis, Claire, Seb, JJ, Harry** et **Chantal,** ah vous connaissez tous la répulsion qui m'anime envers ces manips alors un grand merci pour m'avoir aidée à surmonter les pires moments de ma thèse et finalement après 3 années passées à vous regarder j'ai enfin réussi à réaliser quelques administrations intranasales, vous n'avez donc pas travaillé en vain!!!!*

*Merci aux personnes de l'unité qui m'ont si souvent aidé, que ce soit pour des problèmes informatiques, pour des problèmes de voiture, pour des déménagements, pour mes recherches de post-docs, pour les discussions sur mon avenir… je pense en particulier à **Philippe, Jean-Marc, Muriel, Florian**, **Olivier, Sébastien, Alain** et **Franck.***

*Merci à l'association Doc'J et compagnie avec qui j'ai échangé mes craintes et durant lesquels j'ai construis des amitiés, n'est-ce pas **Karine**, **Audrey**, **Emilie** et ma petite protégée **Tiphaine.***

*Merci à l'équipe d'à côté, **Philippe G, Martine** et en particulier **Tiphaine** pour les mails échangés à travers un couloir, pour nos désaccords permanents sur les présentations et j'en passe, courage ma belle, tu vaux bien plus que ce que tu penses !!!*

Merci à l'équipe d'en face, je pense en particulier au grand cru des thésards de l'année 2009-2010 ! Merci à ***Julien*** *et* ***Stan*** *pour les discussions qu'on a pu partager et pour le temps qu'ils ont passé à essayer de me faire comprendre les stats…*

Maria*, Bien qu'absente pendant ma thèse tu as ta place dans mes remerciements car tu as rendu mon arrivé à l'UESPD très agréable, j'ai tout tenté pour prolonger ma thèse afin qu'on se retrouve à nouveau à l'UEPSD sans pour autant y parvenir !*

Olivier Firmesse*, sans qui je n'aurai sans doute pas fait cette thèse, tu n'étais pas là pour en subir les conséquences mais ce qui est sur, c'est que sans ton insistance ce mémoire n'existerait probablement pas !*

Un grand merci à toutes les personnes de l'unité qui m'ont aidée chacune à leur façon à traverser ces trois années à l'INRA, je pense à ***Naima****,* ***Gérard, Camille, Edith****,* ***Marie-Louise, Denis****, aux secrétariat en particulier* ***Sovanny, Aurore*** *et* ***Christine,*** *à l'équipe de la laverie, à l'équipe de l'animalerie n'est ce pas* ***Benoit, Fatima****! Mais également aux stagiaires, postdocs et thésards qui ont croisé mon chemin (****Gaëlle****,* ***Nassim****,* ***Alhsona, Fabricio, Silvia, Laura, Chloé, Ismael, Nicolas, Luis M, Paola, Tatiana et l'équipe des Brésiliennes****).*

Enfin, un petit clin d'œil pour souligner la solidarité et l'amitié qui règne entre les thésards, post-docs et IE du 440, merci beaucoup!!

Merci à mon amie ***Mathilde,*** *voilà bientôt 7 ans que l'on partage nos vies : mariage, bébés, thèse, que d'émotions, merci ma grande pour tous les bons conseils que tu m'as apportés, tu représentes énormément à mes yeux, j'espère que tu en es consciente. Une petite pensée pour* ***Yann*** *avec qui je peux discuter science sans être prise pour une extra-terrestre…et aussi pour mes amis Chouch et Issam qui ont toujours été à mes côtés…*

Merci à ma famille, ***ma mère, ma sœur, ma nièce, mon neveu, mon père, mon frère****,* ***mes beaux parents*** *qui m'ont porté tout l'amour et le soutien qu'on peut espérer. Je vous aime aussi fous que vous pouvez l'être !!!*

Evidemment je ne peux pas conclure sans remercier la personne qui m'a sans aucun doute le plus soutenu durant ces dix dernières années, mon conjoint ***Vincent****. Sans ton aide, ton soutien et surtout ton amour, je n'aurais pas été capable d'aller jusqu'au bout, alors merci d'être présent pour moi et pour notre famille, je t'aime.*

RESUME

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont caractérisées par une inflammation anormale et récurrente du tractus digestif. De nombreuses études ont démontré des effets bénéfiques de souches probiotiques anti-inflammatoires recombinantes ou non. La première partie de cette thèse décrit différentes stratégies d'optimisation de souches de bactéries lactiques en tant que vecteurs de protéines d'intérêt santé. Nous avons ainsi démontré qu'une modification du peptidoglycane de la paroie de *Lactococcus lactis* influençant la lyse bactérienne ne permettait pas de moduler l'immunogénicité de l'antigène E7 délivré par *L. lactis*. Nous avons également démontré que la nature du vecteur bactérien était un paramètre essentiel dans la vectorisation de la protéine délivrée : ainsi l'espèce *Bifidobacterium infantis* induit une réponse immunitaire spécifique à l'antigène E7 supérieure à celle obtenue avec les vecteurs *L. lactis* et *Lactobacillus plantarum*. La deuxième partie de cette thèse porte sur l'étude des effets anti-inflammatoires de bactéries recombinantes ou non. Nous avons ainsi démontré que la souche *Lb. casei* BL23 produisant une superoxyde dismutase à manganèse permettait de diminuer significativement des colites murines induites par administration de dextran sodium sulfate. Enfin, nous avons mis en évidence des propriétés anti-inflammatoires sur divers modèles d'inflammation *in vitro / in vivo* de *Faecalibacterium prausnitzii,* première bactérie commensale anti-inflammatoire identifiée sur la base de données cliniques humaines.

Mots clefs : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, inflammation, bactérie lactique recombinante, *Lactococcus lactis, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Bifidobacterium infantis, Faecalibacterium prausnitzii*, lysozyme, stress oxydant, superoxyde dismutase.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases are characterized by abnormal inflammation of digestive tract. Several studies have shown positive effects of anti-inflammatory probiotic (native or recombinant) or commensal bacterial strains. The first part of this PhD thesis describes different optimization strategies of the use of lactic acid bacteria as proteins delivery vector. We have shown that the modification of peptidoglycan of *Lactococcus lactis* influencing lysis rate does not confer any advantage in both persistence in gastrointestinal tract and proteins delivery vector abilities. We showed that nature of bacterial vector is an essential parameter to deliver protein of health interest: *Bifidobacterium infantis* could increase higher immune response against E7 antigen than the ones obtained with *L. lactis* and *Lactobacillus plantarum*. In the second part of this PhD thesis, we analized anti-inflammatory effects of recombinant probiotic or commensal bacteria. We showed that *Lb. casei* BL23 producing superoxide dismutase could significantly protect mice from dextran sodium sulfate induced colitis damages. Finally, we observed anti-inflammatory properties on cellulars and animals models of *Faecalibacterium prausnitzii,* the first commensal anti-inflammatory bacterium identified by analysis of human clinical data.

Key words: Inflammatory bowel diseases, inflammation, *Lactococcus lactis, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Bifidobacterium infantis, Faecalibacterium prausnitzii,* lysozyme, oxidative stress, superoxide dismutase.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **3**
RESUME **6**
ABSTRACT **7**
TABLE DES MATIERES **8**
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX **11**
ABREVIATIONS **13**
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES **15**
NOTE DE L'AUTEUR **17**
AVANT PROPOS **19**
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **20**
I. GENERALITES DU SYSTEME DIGESTIF **21**
1) Structure du système digestif 21
- L'intestin grêle 22
- Le côlon 24
- Le microbiote 25

2) Le système immunitaire intestinal 27
- L'immunité innée 28
- L'immunité adaptative 31
- Le système immunitaire intestinal 32

3) Dialogue bactéries hôte 35
II. MICROBIOTE ET MICI **38**
1) Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin 38
- Les mécanismes de l'inflammation 38
- Diagnostic et symptômes 39
- Causes et conséquences des MICI 40
- Objectifs des traitements actuels 42

2) Le stress oxydant et les MICI 43
- Généralités 43
- Les enzymes anti-oxydantes 45
- DAO et MICI 46

3) Rôle du microbiote au sein des MICI 48
4) Rôle des bactéries pathogènes au sein des MICI 53
- Rôle d'*Escherichia coli* adhérents invasifs dans le développement des MICI 53
- Rôle de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* dans le développement des MICI 55

III. PROBIOTIQUES ET MICI **57**
1) Modèles d'études 57
- Les modèles d'études *in vitro :* modèles cellulaires d'origine humaine 57
- Les modèles d'études *in vivo* : modèles murins d'inflammation intestinale 58

2) Probiotiques et MICI 63
- Généralités 63
- *Bifidobacterium. spp* et *Lactobacillus. spp* 65
- Effets anti-inflammatoires et modes d'action 67

3) Bactéries recombinantes et MICI 72
- Présentation des Bactéries Lactiques Génétiquement Modifiées (BLGM) 72
- BLGM et MICI 80
- Limites de la stratégie BLGM 82

CHAPITRE 2 : RESULTATS 85

I. OPTIMISATION DE SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES EN TANT QUE VECTEURS DE PROTEINES D'INTERET SANTE 87

1) Expression et purification de l'antigène E7 de l'HPV-16, protéine modèle pour l'étude de la réponse immunitaire chez la souris 87
- Présentation du virus HPV-16 et de l'antigène E7 87
- Matériels et Méthodes 90
- Résultats - Discussions 94

2) Influence de la lyse sur la réponse immunitaire 96
- Contexte de l'étude 96
- Objectifs et stratégies 96
- Résultats 97
- Conclusions et perspectives 97
- Article : Variations of N-acetylation level of peptidoglycan do not influence persistence of *Lactococcus lactis* in the gastrointestinal tract 98

3) Les lactobacilles et les bifidobactéries peuvent-elles constituer des vecteurs efficaces pour délivrer des protéines d'intérêt santé ? 118
- Contexte de l'étude 118
- Objectifs et stratégies 118
- Résultats 118
- Conclusions et perspectives 119
- Article : Bifidobacteria as a new vector for mucosal delivery of therapeutic proteins 119

II. ETUDE DES EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES DE SOUCHES RECOMBINANTES ET COMMENSALES 142

1) Etude des effets anti-inflammatoires de *Lactobacillus casei* BL23 produisant la catalase et la superoxyde dismutase à manganèse 143
- Contexte de l'étude 143
- Objectifs et stratégies 143
- Résultats 144
- Conclusions et perspectives 144
- Article : Intragastric administration of a superoxide dismutase producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice 145

2) Etude des effets anti-inflammatoires d'une bactérie commensale, *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 173
- Contexte de l'étude 173
- Objectifs et stratégies 173
- Résultats 174
- Conclusions et perspectives 174

• Article : *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients 175

CHAPITRE 3 : DISCUSSIONS-PERSPECTIVES 182

I. PROBLÉMATIQUE 183

II. IDENTIFICATION DES MÉCANISMES D'ACTION DES BACTÉRIES ET DES MOLÉCULES POSSÉDANT DES EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES 184

1) Etude d'une bactérie commensale 184
2) Etude de protéines anti-inflammatoires 185

III. TRANSPORT DES MOLÉCULES ANTI-INFLAMMATOIRES AU SEIN DU TRACTUS DIGESTIF PAR L'INTERMÉDIAIRE DE BACTÉRIES LACTIQUES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES 187

1) Amélioration des capacités de vectorisation des BLGM 187
2) Combiner les propriétés de bactéries probiotiques génétiquement modifiées aux propriétés anti-inflammatoires de nouvelles molécules identifiées 189

IV. PERSPECTIVE GÉNÉRALE 189

CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE 191

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Fig. 1: Structure du système digestif (Villarrea, 2006). 21
Fig. 2: Structure de l'intestin grêle. 23
Fig. 3: La muqueuse intestinale. 24
Fig. 4: La muqueuse colique. 25
Fig. 5: Répartition des *phyla* majoritaires qui composent le microbiote intestinal (Tap et al., 2009). 26
Fig. 6: Microcopie à balayage d'un macrophage (Kindt et al., 2008). 29
Fig. 7: Schéma représentant l'ensemble des acteurs majeurs du système immunitaire. 30
Fig. 8: Induction des voies Th1, Th2 et Th17 (Medzhitov, 2007). 32
Fig. 9: Schéma représentant le SII. 33
Fig. 10: A gauche : une cellule M intestinale ; A droite : transport d'Ag et présentation à un LT *via* une CPA. 33
Fig. 11: Les TLR et les ligands associés. 34
Fig. 12: Schéma représentant la cascade d'activation NF-κB *via* l'activation du TLR-4. 35
Fig. 13: Dialoque bactéries-hôte (MacPherson et Harris., 2004). 36
Fig. 14: Image d'endoscopie entre un côlon sain (à gauche) et un côlon enflammé d'un patient atteint d'une RCH (à droite). 39
Fig. 15: Symptômes extra digestifs de la MC. 40
Fig. 16: Production de DAO par les enzymes NOS, NADPH et MPO présentes dans les phagocytes (Rochat et al., 2007). 44
Fig. 17: Mode d'action des enzymes antioxydantes sur la formation des DAO lors de la dégradation de l'oxygène. 46
Fig. 18: Schéma représentant la dysbiose du microbiote (Round and Mazmanian, 2009). 49
Fig. 19: Schéma représentant la dysbiose observée dans le microbiote fécal des patients atteints de MICI. 51
Fig. 20: *Faecalibacterium prausnitzii*, microscope (x1000) (Watterlot., 2008; UEPSD-INRA). 52
Fig. 21: Jonctions complexes apicales de cellules épithéliales mononucléaires MDCK-1 saines (à gauche) et infectées par AIEC (à droite) (Wine et al., 2009). 55
Fig. 22: Mode opératoire de la colite murine induite au DSS. 59
Fig. 23: Coupe histologique de muqueuse murine enflammée ou non avec du DSS (Watterlot *et al.*, soumis). 60
Fig. 24: Mode opératoire de la colite murine induite au TNBS. 61
Fig. 25: Muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS. 62
Fig. 26: Coupe histologique de muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS, évaluées selon le score d'Ameho. 62
Fig. 27: *Bifidobacterium longum* (Schell, université de Georgie). 65
Fig. 28: *Lactobacillus plantarum* (Kunkel., 2004). 66
Fig. 29: Schéma représentant les mécanismes des CD dans la reconnaissance des bifidobactéries (Zeuthen et al., 2008). 70
Fig. 30: *Lactococcus lactis.* 73
Fig. 31: Sécrétion d'une protéine d'intérêt. 76
Fig. 32 : Ancrage d'une protéine d'intérêt à la paroi bactérienne. 77
Fig. 33: Système d'expression NICE. 78
Fig. 34: Système de traitement de cancer du sein utilisant le genre *Bifidobacterium* en tant que vecteur de la cytosine deaminase (Fujimori, 2006). 80

Fig. 35: Dénombrements dans l'iléon et les fèces de porc de *L. lactis* MG1363 et de *L. lactis* Thy12. 83
Fig. 36: Structure de la capside de l'HPV-16. 88
Fig. 37: Organisation génétique de l'HPV-16 (A) et structure de la protéine E7 (B). 89
Fig. 38: Souches utilisées. 90
Fig. 39:Plasmides utilisés. 91
Fig. 40: Carte du plasmide pStaby :E7. 93
Fig. 41: Analyse de la purification d'E7 par bleu de Coomassie. Fig. 42: Analyse de la purification d'E7 par Western Blot. 94
Fig. 43: Structure du PEG et mode d'action du lysozyme et de la peptidoglycane déacétylase. 97

ABREVIATIONS

- 5-ASA : 5 amino salisylic acid
- AAF : aérobie anaérobie facultatif
- Ac : anticorps
- ADN : acide désoxyribonucléique
- Ag : antigène
- AIEC : *Escherichia coli* adhérent invasif
- *B.* : *Bifidobacterium*
- BL : bactérie lactique
- BLGM : bactérie lactique génétiquement modifiée
- C : cytosine
- CAT : catalase
- CD : cellule dendritique
- *Cl.* : *Clostridium*
- CNK : cellule natural killer
- CPA : cellule présentatrice d'antigène
- CpG : cytosine phosphoryl guanine
- Cu/Zn SOD : copper / zinc superoxyde
- DAO : dérivé actif de l'oxygène
- DSS : dextran sodium sulfate
- *E.* : *Escherichia*
- EC-SOD : superoxyde dismutase extra-cellulaire
- *F.* : *Faecalibacterium*
- FC : fluoro-cytosine
- FU : fluoro uracil
- *G :* guanine
- GRAS : generally reconize as safe
- H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
- HPV16 : papillomavirus humain de type 16
- IFN : interféron
- Ig : immunoglobuline
- IL : interleukine
- IPTG : isopropyl β-D1-thiogalactopyranoside
- IRAK : IL-1 receptor associated kinase
- KO : knockout
- *L.* : *Lactococcus*
- *Lb. Lactobacillus*
- LB : lymphocyte B
- LGG : *Lactobacillus rhamnosus*
- LPS : lipopolysaccharide
- LT : lymphocyte T
- LTIE : lymphocytes T intra-épithéliaux
- MALT : mucosa associated lymphoid tissue
- MAP : *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*
- MC : maladie de Crohn
- MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

- Mn SOD : superoxyde dismutase à manganèse
- MPO : myeloperoxydase
- NICE : nisine controlled expression
- NO : oxyde nitrique
- NOS : NO synthase
- NOD : Nod like receptor
- $O_2^{\circ\cdot}$: ion superoxyde
- OH° : radical hydroxyle
- P : promoteur
- PBMC : peripheral blood monocyte cell
- PCR : polymerase chain reaction
- PEG : peptidoglycane
- PP : pourcentage de protection
- PRR : pattern recognition receptor
- PS : peptide signal
- PVDF : polyfluorure de vinylidène
- RCH : rectocolite hemorragique
- SII : système immunitaire intestinal
- SOD : superoxyde dismutase
- SPase : signal peptidase
- T7 p : T7 RNA polymérase
- TD : tractus digestif
- TGF-β : transforming growth factor beta
- TLR : toll like receptor
- TNBS : 2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid
- TNF : tumor necrosis factor
- TRAF6 : TNF receptor associated factor 6
- Treg : lymphocyte T regulateur
- UFC : unité formant colonie

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

H. Sokol, B. Arnaud-Pigneur, **L. Watterlot**, O. Lakhdari, H. Blottière, C. Grangette, G. Trugnan, J. Doré, G. Thomas, P. Marteau, P. Seksik, P. Langella. *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients.* PNAS, 2008 Oct 28;105(43):16418-25.

L. Watterlot, M. Meyrand, N. Gaide, S. Blugeon, JJ. Gratadoux, M. José Flores, P. Langella, MP. Chapot-Chartier and LG. Bermúdez-Humarán. *Variations of N-acetylation level of peptidoglycan do not influence persistence of* Lactococcus lactis *in the gastrointestinal tract.* En révision dans le journal "International Journal of Food Microbiology"

L. Watterlot, T. Rochat, H. Sokol, C. Cherbuy, I. Bouloufa, F. Lefèvre, JJ. Gratadoux, E. Honvo-Houeto, S. Chilmonczyk, S. Blugeon, G. Corthier, P. Langella and LG. Bermúdez-Humarán. *Intragastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant* Lactobacillus casei *BL23 strain attenuates DSS colitis in mice.* En révision dans le journal "International Journal of Food Microbiology"

Laurie Watterlot, Naima G. Cortes-Perez, Sébastien Blugeon, Chantal Bridonneau, Gérard Corthier, Philippe Langella and Luis G. Bermúdez-Humarán. *Bifidobacteria: as a new vector for mucosal delivery of therapeutic proteins.* En préparation.

Communications orales avec comité de lecture

L. Watterlot, T. Rochat, C. Cherbuy, I. Bouloufa, JJ. Gratadoux, S. Blugeon, S. Chilmonczyk, E. Honvo-Houeto G. Corthier, H. Sokol, P. Langella and LG. Bermúdez-Humarán. *Intragastric co-administration of recombinant* lactobacillus casei *producing superoxide dismutase attenuates DSS colitis en mice*. Cibus, 2009, (5):45.

L. Watterlot, Naima G. Cortes-Perez, Sébastien Blugeon, Chantal Bridonneau, Gérard Corthier, Philippe Langella and Luis G. Bermúdez-Humarán. *Bifidobacteria as new vector for mucosal delivery of therapeutic proteins*. Cibus, 2009, (5):46.

H. Sokol, B. Arnaud-Pigneur, **L. Watterlot**, O. Lakhdari, H. Blottière, C. Grangette, G. Trugnan, J. Doré, G. Thomas, P. Marteau, P. Seksik, P. Langella. Fecalibacterium prausnitzii, *a novel anti-inflammatory commensal bacterium identified by fish*. Cibus, 2009, (5):28.

Communications orales

L. Watterlot, T. Rochat, C. Cherbuy, I. Bouloufa, JJ. Gratadoux, S. Blugeon, S. Chilmonczyk, E. Honvo-Houeto G. Corthier, H. Sokol, P. Langella and LG. Bermúdez-Humarán. *L'administration intragastrique d'une souche anti-inflammatoire de* Lactobacillus casei *produisant une superoxide dismutase atténue la sévérité de la colite au DSS chez la souris.* Club des Bactéries Lactiques, Toulouse, 2009 et Colloque Doc'J, Jouy en Josas, 2009.

H. Sokol, B. Arnaud-Pigneur, **L. Watterlot**, O. Lakhdari, H. Blottière, C. Grangette, G. Trugnan, J. Doré, G. Thomas, P. Marteau, P. Seksik, P. Langella. *Counterbalancing dysbiosis in Crohn's disease:* Faecalibacterium prausnitzii, *a major commensal bacterium, exhibits* in vitro *and* in vivo *anti-inflammatory effects*. 15èmes journées européennes de pathologie digestive, Paris, 2007.

H. Sokol, B. Arnaud-Pigneur, **L. Watterlot**, O. Lakhdari, H. Blottière, C. Grangette, G. Trugnan, J. Doré, G. Thomas, P. Marteau, P. Seksik, P. Langella. Faecalibacterium prausnitzii, *a major commensal bacterium, exhibits anti-inflammatory effects in cellular models and TNBS induced colitis*. 30ème Congrès International d'Ecologie Microbienne et des Maladies, Rome, 2007.

Communications affichées

L. Watterlot, Cortez-Perez, S. Blugeon, C. Bridonneau, G. Corthier, P. Langella . and L. Bermudez, *Les bifidobactéries sont-ils de bons vecteurs de protéines d'intérêt thérapeutique au niveau des muqueuses ?* Club des Bactéries Lactiques, Toulouse, 2009.

L. Watterlot, N. Cortez-Perez, S. Blugeon, C. Bridonneau, G. Corthier, P. Langella . and L. Bermudez, *Analysis of the immune response in mice induced by the intragastric administration lactobacilli or bifidobacteria producing HPV16-E7 antigen.* 9th Symposium on lactic acid bacteria, Egmond aan zee, Holande, 2008.

L. Watterlot, T. Rochat, I. Bouloufa, H. Sokol, JJ. Gratadoux, S. Blugeon, G. Corthier, P. Langella . and L. Bermudez, *Improvement of a DSS-induced colitis in mice using two recombinant* Lactobacillus casei *strains expressing a manganese catalase or a manganese superoxide dismutase.* 9th Symposium on lactic acid bacteria, Egmond aan zee, Holande, 2008.

P. Langella, B. Arnaud-Pigneur, **L. Watterlot**, O. Lakhdari, H. Blottière, C. Grangette, G. Trugnan, J. Doré, G. Thomas, P. Marteau, P. Seksik and H. Sokol, *The commensal firmicute* Faecalibacterium prausnitzii *exhibits* in vitro *and* in vivo *anti-inflammatory effects with potential applications for Crohn's disease*. 9th Symposium on lactic acid bacteria, Egmond aan zee, Holande, 2008.

L. Watterlot, G. Corthier, S. Blugeon, L. Bermudez et P. Langella, *Les Bifidobactéries sont-elles de plus efficace vecteurs de pour délivrer des protéines d'intérêt santé que les lactocoques.* 15ème colloque du Club des Bactéries Lactiques, Rennes, 2007.

L. Watterlot, G. Corthier, P. Langella et L. Bermudez-Humaran. *Construction d'un vecteur de sécrétion de protéines hétérologues chez* Bifidobacterium.spp. Société Française de Microbiologie, Nantes, 2007.

L. Watterlot, G. Corthier, P. Langella et L. Bermudez-Humaran. *Construction de trois vecteurs pour la production intracellulaire et la sécrétion de protéines hétérologues chez* Bifidobacterium.spp. 14ème colloque du Club des Bactéries Lactiques, Paris, 2005.

NOTE DE L'AUTEUR

Depuis toujours, l'étude du vivant me passionne, décrypter de quelle manière fonctionne un organisme si complexe que l'être humain, que tant de mystère reste encore à déceler. J'ai découvert la microbiologie lors de mon IUT et c'est avec une curiosité insatiable que j'ai étudié ce nouveau monde; c'est donc tout naturellement que j'ai souhaité poursuivre mes études dans un domaine qui alliait ces deux spécialités. J'ai alors intégré une école d'ingénieur spécialisée en microbiologie des procédés alimentaires, le thème « alicament » m'avait à l'époque interpellé et c'est ainsi que je me suis tout naturellement orientée vers un stage de Master puis une thèse portant sur l'étude des probiotiques et de leurs interactions avec l'hôte.

Ma thèse a été réalisée sous la direction de P. Langella au sein de l'équipe « Interactions des bactéries commensales et probiotiques avec l'hôte » qu'il dirige au sein de l'Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif. J'ai également bénéficié de l'encadrement de L. Bermudez-Humaran, chercheur de l'équipe spécialisé dans la biologie moléculaire des bactéries lactiques, ainsi que de C. Cherbuy, ingénieur de recherche, spécialisée en biologie cellulaire. Cet encadrement m'a permis d'allier les expertises, les connaissances et les qualités de chacun de mes trois encadrants dans le but de mener à bien cette thèse.

La réalisation de ce doctorat a été pour moi une expérience inoubliable comprenant des réussites et des échecs, des remises en cause mais également de la prise de confiance en soi. Cette expérience m'a permis de découvrir le monde de la recherche et le fonctionnement d'un laboratoire où j'ai effectué de nombreuses expériences scientifiques et connu de nombreuses expériences humaines. J'espère que la lecture de ce mémoire vous permettra de comprendre de quelle manière je me suis investie dans cette thèse et le plaisir que j'ai eu à la réaliser.

L'introduction bibliographique de ce manuscrit propose de vous faire voyager dans le monde de l'infiniment petit et de ses relations avec l'hôte humain. Vous y trouverez dans un premier temps les informations générales liées à la physiologie du système digestif, au système immunitaire intestinal ainsi que les généralités concernants le dialogue bactéries-hôte. Dans un deuxième temps, vous y trouverez le descriptif des MICI ainsi que le rôle du stress oxydant, des bactéries commensales et pathogènes dans le développement de ces maladies. Enfin, ce mémoire vous transportera dans le futur par l'étude de nouvelles

stratégies thérapeutiques utilisant des bactéries probiotiques naturelles ou génétiquement modifiées dans le cadre du traitement de l'inflammation intestinale.

La deuxième partie de ce mémoire expose l'ensemble des travaux effectués, ainsi je vous présenterai des résultats non publiés concernant notre protéine modèle utilisée afin d'étudier la réponse immunitaire. Je vous commenterai également notre article paru dans la revue *Proceedings of the National Academy of Sciences*, deux articles actuellement en révision dans le journal *International Journal on Food Microbiology*, ainsi que les résultats qui feront l'objet d'un article actuellement en préparation dans le but d'être soumis au journal *Journal of Immunology*.

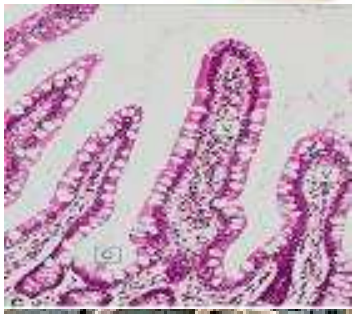
Pour terminer ce manuscrit, j'ai choisi de discuter mes résultats et d'exposer les perspectives à long terme, dans le context des MICI, de l'ensemble des travaux réalisés pendant ma thèse.

A présent, je vous souhaite une bonne lecture et j'espère sincèrement que vous prendrez autant de plaisir à lire ce mémoire que j'en ai eu à l'écrire.

AVANT PROPOS

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé au-delà des effets nutritionnels traditionnels. Il s'agit, pour la plupart, de bactéries lactiques (BL) ingérées par les consommateurs *via* des produits laitiers fermentés. Les effets positifs de probiotiques ont été démontrés dans la prévention et le traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Les MICI sont des pathologies invalidantes et de longue durée qui se caractérisent par une inflammation anormale et récurrente du tractus digestif (TD). La recherche de nouvelles pistes de prévention ou de thérapie a mis en évidence un intérêt potentiel de souches probiotiques vis-à-vis de ces pathologies digestives : d'une part, parce que certaines souches bactériennes possèdent, par elles-mêmes, des propriétés anti-inflammatoires, d'autre part, parce qu'elles peuvent constituer des vecteurs bactériens attractifs pour la libération de protéines thérapeutiques dans le TD. Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse a été i) d'étudier les effets anti-inflammatoires de souches recombinantes ou commensales et ii) d'optimiser différentes souches de BL en tant que vecteur de protéines d'intérêt santé. Afin de répondre au premier objectif, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude du stress oxydant vis-à-vis de l'inflammation, par la construction puis l'analyse des effets anti-inflammatoires de souches de *Lb. casei* BL23 produisant des enzymes anti-oxydantes (Watterlot *et al*., en révision), puis, dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets anti-inflammatoires de *F. prausnitzii* A2-165, première bactérie commensale anti-inflammatoire identifiée sur la base d'essais cliniques (Sokol *et al*., 2008). Afin de répondre au deuxième objectif de ma thèse, nous avons travaillé sur plusieurs types de BL : i) *L. lactis*, BL traditionnellement utilisée comme vecteur de protéines (Watterlot *et al*., en révision); ii) *Lb. plantarum* et *Lb. casei*, appartenant à un genre bactérien qui persistent plusieurs jours dans le TD; et iii) *B. infantis*, bactérie commensale adaptée aux conditions particulières du TD (Watterlot *et al*., manuscrit en préparation).













CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITES DU SYSTEME DIGESTIF

1) Structure du système digestif

Le système digestif est composé successivement de la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jejunum et iléon), le caecum, le côlon ou gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) puis se termine par le rectum et l'anus (Fig. 1).

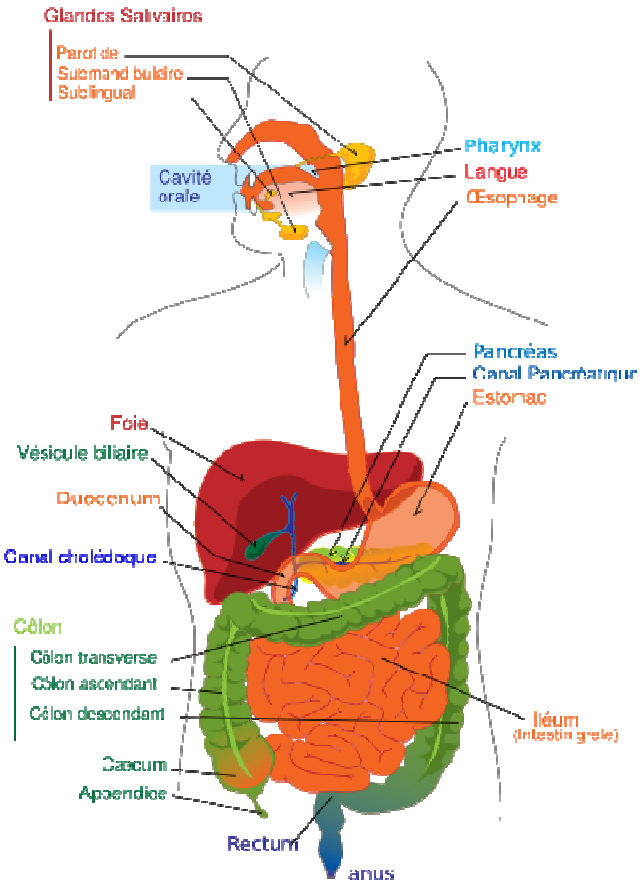


Fig. 1: Structure du système digestif (Villarrea, 2006).

La physiologie du tube digestif est constituée de 5 tuniques concentriques situées respectivement de la lumière vers l'intérieur de l'organisme (Fig. 2):

La muqueuse, qui comporte un épithélium de revêtement ainsi qu'un tissu conjonctif sous-jacent : le chorion ou *lamina propria*, qui lui-même contient des tissus lymphoïdes diffus

ainsi que des follicules lymphoïdes. **La *muscularis mucosae*, la sous-muqueuse, la musculaire externe** comprenant la partie circulaire interne et longitudinale externe ainsi que **la tunique externe** constituée par un tissu conjonctif lâche qui la rend solidaire aux organes voisins (André *et al.*, 2002).

La paroi du tube digestif comporte de nombreuses cellules immunitaires. Les plasmocytes et les lymphocytes T intra-épitheliaux (LTIE) sont principalement détectés au sein de l'épithélium. Les lymphocytes B (LB) et des plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines A (IgA) sont essentiellement répartis dans des follicules lymphoïdes au sein du tissu conjonctif du chorion de la muqueuse et de la sous muqueuse.

A présent, nous allons détailler i) la physiologie de la muqueuse, en particulier l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon, qui est en contact direct avec la lumière ii) la composition du microbiote et iii) les fonctions du système immunitaire intestinal.

- **L'intestin grêle**

L'intestin grêle mesure 4 à 7 m chez l'homme. Les parois sont recouvertes de plis circulaires, de villosités et de microvillosités formant la bordure en brosse, ce qui lui confère une surface d'échange avec la lumière de 400 m^2 en moyenne. Les sécrétions intestinales permettent de maintenir un pH neutre ou légèrement basique au alentour de 8. L'intestin grêle est le siège de phénomènes d'absorption mais joue également un rôle dans les phénomènes de sécrétion et participe à la réponse immunitaire. Il comprend le duodénum (0,25 m), le jejunum (2,5 m) et l'iléon (3,5 m).

La muqueuse de l'intestin grêle comprend un étage composé de villosités ainsi qu'un étage composé de glandes de Lieberkühn (ou cryptes) (Fig. 3) (Sergi, 1997; André *et al.*, 2002).

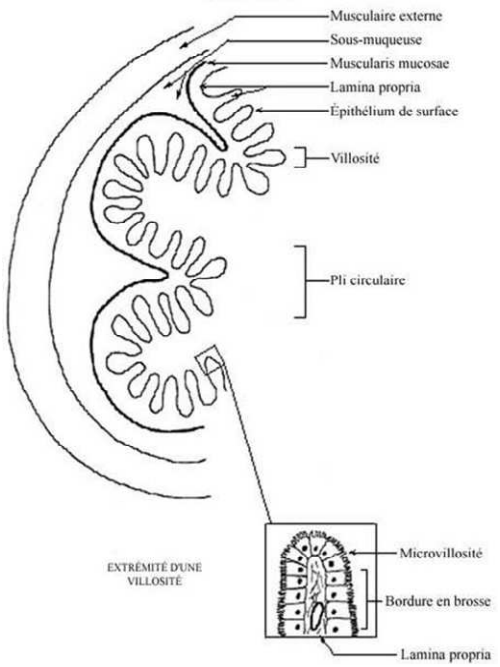


Fig. 2: Structure de l'intestin grêle.

Les villosités s'étendent vers la lumière et sont tapissées par l'épithélium prismatique simple constitué de plusieurs types cellulaires dont les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules neuroendocrines et au niveau de l'iléon, appartenant au système immunologique, les cellules « M ».

Les entérocytes sont les principales cellules de l'épithélium et sont plus spécifiquement responsables de la fonction d'absorption des nutriments.

Les cellules caliciformes sont des cellules à mucus qui permettent de protéger l'intestin de l'agression des sucs gastriques mais qui jouent également un rôle dans la protection vis-à-vis des bactéries de la lumière.

Les cellules neuroendocrines sont responsables de la sécrétion hormonale.

Les cellules M, (microfold cells) situées au niveau des plaques de Peyer (amas constitués de 20 à 40 lymphoïdes situés principalement dans la partie terminale de l'iléon, dans le chorion et dans la sous-muqueuse), jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire.

Les cryptes ou glandes de Lieberkühn sont composées de cellules immatures en prolifération donnant naissance à cinq types cellulaires : des cellules caliciformes, des entérocytes, des cellules « intermédiaires », des cellules neuroendocrines et au fond des cryptes les cellules de Paneth. Ces dernières, sont des cellules sécrétrices de lysozymes et de défensines qu'elles déversent dans la lumière des cryptes contribuant ainsi à l'effet barrière de la muqueuse intestinale.

Les cellules de l'épithélium ont un renouvellement très rapide (4 à 5 jours). Des cellules souches pluripotentes sont situées au fond de la crypte, elles prolifèrent et les cellules filles issues de leur division se différencient pendant leur migration le long des villosités. Seules les cellules de Paneth restent au fond des cryptes.

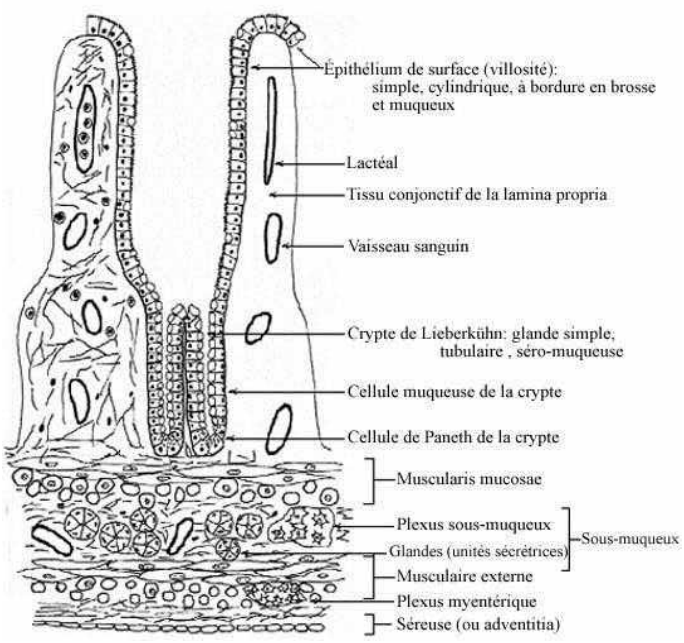


Fig. 3: La muqueuse intestinale.

- **Le côlon**

De calibre plus large que l'intestin grêle, le gros intestin mesure environ 1,5 m de long, il comprend le côlon ascendant, transversal et descendant. Le pH est compris entre 4,7 et 7,5 respectivement dans sa partie proximale et distale. A la différence de la muqueuse de l'intestin grêle, le côlon ne comporte pas de villosités mais un épithélium plan (ou épithélium de surface), d'autre part, les cellules de Paneth y sont absentes. L'épithélium est constitué de colonocytes, cellules responsables de l'absorption de l'eau et des électrolytes, de cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines. Le chorion lui, est riche en tissu lymphoïde.

Les fonctions du côlon sont i) la déshydratation du bol alimentaire (absorption de l'eau et des électrolytes); ii) la digestion terminale de la cellulose et autres polysaccharides résistant à la digestion au niveau de l'intestin grêle par le microbiote et iii) l'évacuation des déchets alimentaires.

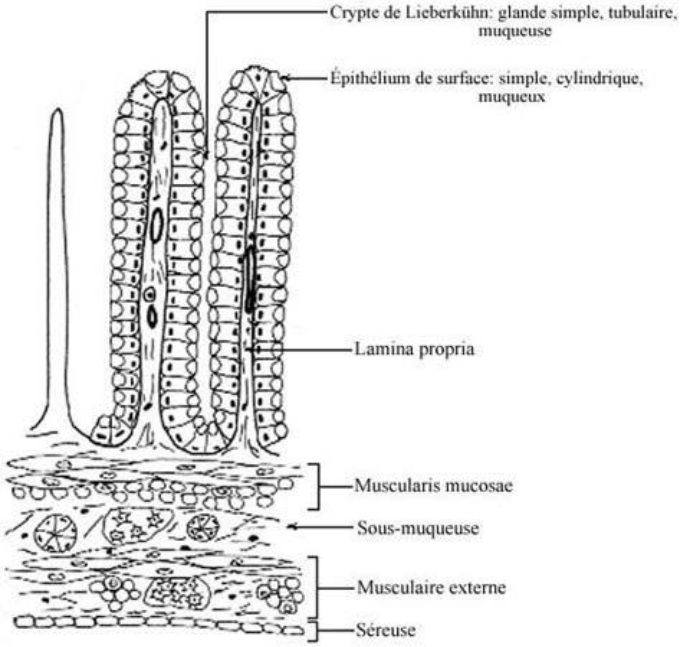


Fig. 4: La muqueuse colique.

- **Le microbiote**

L'écosystème est défini comme étant l'ensemble des structures relationnelles qui lient les êtres vivants entre eux et à leur environnement inorganique (Ellemberg 1943).

L'écosystème microbien digestif est composé du microbiote, de l'hôte et des aliments ; il est responsable de l'homéostasie et participe au maintien de la santé de l'hôte.

Le microbiote comporte 10^{14} microorganismes vivant en symbiose avec l'hôte soit plus de 100 fois le nombre de cellules de l'organisme humain (Gill *et al*., 2006). *In utero*, le tube digestif est stérile, les premières colonisations se font principalement par la flore vaginale, intestinale et cutanée de la mère lors de la naissance, ainsi que par l'environnement extérieur (O'Hara and Shanahan, 2006). Sa composition va par la suite évoluer en fonction de l'environnement et de l'alimentation de l'hôte, pour se stabiliser vers les deux ans de

l'individu. Chaque homme possède donc son propre microbiote, reflet de son environnement. Chez l'individu sain, le microbiote, une fois stabilisé, ne subira que des changements ponctuels, conséquence de la prise d'antibiotiques ou d'un changement d'alimentation.

Très complexe et diversifié, le microbiote est composé d'environ 1000 espèces différentes réparties selon trois *phyla* majoritaires, le *phylum* des Firmicutes représentant 79% du microbiote, constitué principalement de bactéries à Gram positif à bas GC. La plus grande majorité des espèces des Firmicutes appartient à la classe des Clostridii parmi lesquels on retrouve les groupes *Clostridium coccoides* et *Cl. Leptum*. Moins de 5% des autres espèces du *phylum* Firmicutes appartiennent aux classes Mollicutes et Bacillii.

Les deux autres *phyla* majoritaires sont *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* qui représentent respectivement 17% et 3% de l'écosystème intestinal (Lay *et al.*, 2005; Tap *et al.*, 2009) (Fig. 5). Enfin, les autres *phyla* rencontrés sont principalement ceux des *Proteobacteria* et *Verrumicrobia* qui ne représentent que quelques pourcents des bactéries totales.

Les progrès effectués concernant l'analyse génomique des procaryotes a fait considérablement évoluer la taxonomie. Anciennement basée sur l'analyse morphologique (coque/bacille) et phénotypique (coloration de Gram), elle est aujourd'hui basée sur l'analyse métagénomique *via* l'ARN ribosomique 16S. En effet, il s'est avéré que les précédentes techniques de classification ne permettaient pas d'obtenir une classification totale des espèces peuplant le microbiote mais uniquement des espèces cultivables qui ne représentent que 30% de l'écosystème intestinal.

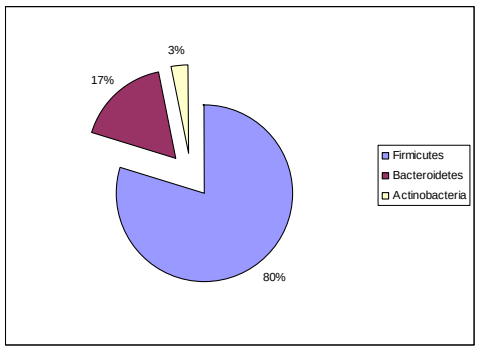


Fig. 5: Répartition des *phyla* majoritaires qui composent le microbiote intestinal (Tap et al., 2009).

Parmi les espèces rencontrées au sein du TD, 99% sont anaérobies. La concentration et la diversité bactérienne augmentent parallèlement avec l'augmentation du pH. La composition varie en fonction de la teneur en oxygène qui diminue le long du TD, ainsi, l'estomac est constitué d'environ 10^4 unités formants colonies (UFC)/g de contenu, le duodénum

et le jéjunum sont constitués de 10^4 à 10^7 UFC/g, la majeure partie étant des bactéries aérobies anaérobies facultatives (AAF) telles que des lactobacilles, des streptocoques ou encore des entérobactéries. Dans l'iléon, la proportion augmente de 10^5 à 10^7 UFC/g, principalement constitué de bactéries AAF et anaérobies telles que *Bacteroides*, enfin le côlon contient 10^9 à 10^{11} UFC/g de contenu principalement anaérobies strictes telles que *Bacteroides, Eubacterium, Peptostreptococcus, Bifidobacterium* et *Clostridium* (Butel and Collignon, 2004).

On peut distinguer le **microbiote endogène** ou **autochtone,** qui colonise principalement le côlon et qui est capable de se multiplier *in vivo*, du **microbiote en transit** ou **allochtone,** qui provient principalement de l'alimentation et persiste peu de temps au sein du TD. Les principales fonctions du microbiote peuvent être définies selon 3 catégories:

Les fonctions métaboliques : le microbiote réalise la fermentation des résidus alimentaires non digestibles et produit ainsi des acides gras à chaînes courtes tels que le butyrate, de l'énergie et des vitamines essentielles au développement de l'hôte (Wong *et al*., 2006; Macfarlane and Macfarlane, 2007).

Les fonctions trophiques : le microbiote participe au développement de l'angiogénèse de l'intestin *via* les cellules de Paneth, et aide ainsi au développement du système immunitaire (Stappenbeck *et al*., 2002; Macpherson and Harris, 2004).

Les fonctions de protection : le microbiote permet d'augmenter l'effet barrière de la muqueuse intestinale en colonisant les sites de fixation à la muqueuse du TD, en créant une compétition vis-à-vis des nutriments ou encore en libérant des composés anti-microbiens luttant ainsi contre les bactéries pathogènes (Hooper *et al.*, 2003).

2) Le système immunitaire intestinal

Le système digestif met en relation des hommes et des microorganismes autour d'un support physiologique qui constitue une barrière entre un environnement extérieur (air, eau et aliment) et l'intérieur de notre organisme (cellules, lymphe et sang). Afin de maintenir l'équilibre fragile qui constitue cet écosystème, l'intestin a dû développer des fonctions immunitaires permettant de maintenir l'homéostasie intestinale. Le système immunitaire intestinal (SII)

évolue donc en symbiose avec le microbiote qui en échange de la tolérance, exerce des effets bénéfiques pour l'hôte. Outre, la digestion de certains métabolites, le microbiote permet d'optimiser le fonctionnement de notre SII mais également le fonctionnement de notre système immunitaire systémique.

Dans le prochain chapitre « Dialogue bactéries-hôte », nous nous intéresserons aux effets du microbiote sur nos fonctions immunes, mais avant cela, il est nécessaire de rappeler quelques notions concernant l'immunité et les mécanismes impliqués dans les processus inflammatoires.

On distingue principalement l'immunité innée qui correspond à la première ligne de défense de l'organisme face à une agression, de l'immunité adaptative qui correspond à une immunité acquise, spécifique envers un antigène (Ag) donné et qui fait intervenir des notions de mémoire.

- **L'immunité innée**

Il s'agit d'une immunité non spécifique, immédiate qui constitue la première ligne de défense de l'organisme face à une infection, elle ne fait pas intervenir de notion de mémoire mais elle fait appel à plusieurs processus.

L'effet barrière

La peau et les membranes des muqueuses constituent les toutes premières barrières anatomiques. Au niveau du TD, la présence de l'épithélium a un rôle de barrière essentiel afin de séparer les micro-organismes composant le microbiote et présent dans la lumière de la *lamina propria*. L'effet barrière se compose également d'actions mécaniques induites par les mouvements péristaltiques de l'intestin et du côlon, d'actions chimiques (pH acide, enzymes, peptides anti-microbiens…). Enfin, la présence du microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la prévention d'une infection en créant une compétition vis-à-vis des nutriments, des sites de fixations à la muqueuse ou encore, en produisant des peptides anti-microbiens.

La phagocytose

Les cellules phagocytaires sont les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages (monocytes différenciés) et les cellules dendritiques (CD) (Fig. 6). Leur fonction principale est de phagocyter les organismes étrangers et d'induire une réaction inflammatoire. La phagocytose fait intervenir différents mécanismes pour éliminer les cellules bactériennes potentiellements pathogènes tels que la production de dérivés actifs de l'oxygène (DAO), de peptides anti-microbiens (défensine), d'enzymes (lysozyme) ou encore de compétiteurs tels que la lactoferrine.



Fig. 6: Microcopie à balayage d'un macrophage (Kindt et al., 2008).

Le complément

Le complément est constitué d'un groupe de protéines sériques, son rôle majeur est la reconnaissance puis la destruction des pathogènes. Le complément est activé par des médiateurs solubles tels que les lectines spécifiques du mannose (MBL pour mannose-biding lectin) et la protéine C réactive. Les différents composants du complément interagissent afin d'induire i) la lyse des cellules, des bactéries et des virus ; ii) l'opsonisation ou capture d'Ag particulaire favorisant la phagocytose; iii) l'activation de la réponse inflammatoire et iv) l'élimination des complexes immuns (Complexe anticoprs (Ac) des phagocytes / Ag des bactéries) vers le foi et la rate. Enfin, l'interaction des protéines du complément avec les

récepteurs de surface des cellules du système immunitaire permet de participer au contrôle de la réponse innée et adaptative.

Les cellules Natural Killer (CNK)

Les CNK sont spécialisées dans la lyse des cellules tumorales et des cellules infectées par des virus, et ce sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée. En effet, elles sont capables de cibler puis tuer les cellules envahies, de produire des cytokines telles que le tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) et l'interferon-γ (IFN-γ) permettant ainsi de stimuler la maturation des CD, d'activer les macrophages et d'induire une réponse de type Th1.

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Les CPA permettent d'établir le lien entre la réponse innée et adaptative. Il s'agit principalement des monocytes, macrophages et CD. Après reconnaissance des pathogènes et captures de leurs Ag, les CPA migrent vers les tissus lymphoïdes et présentent alors les Ag dégradés en peptides aux lymphocytes T (LT) permettant d'activer ainsi la réponse immunitaire adaptative.

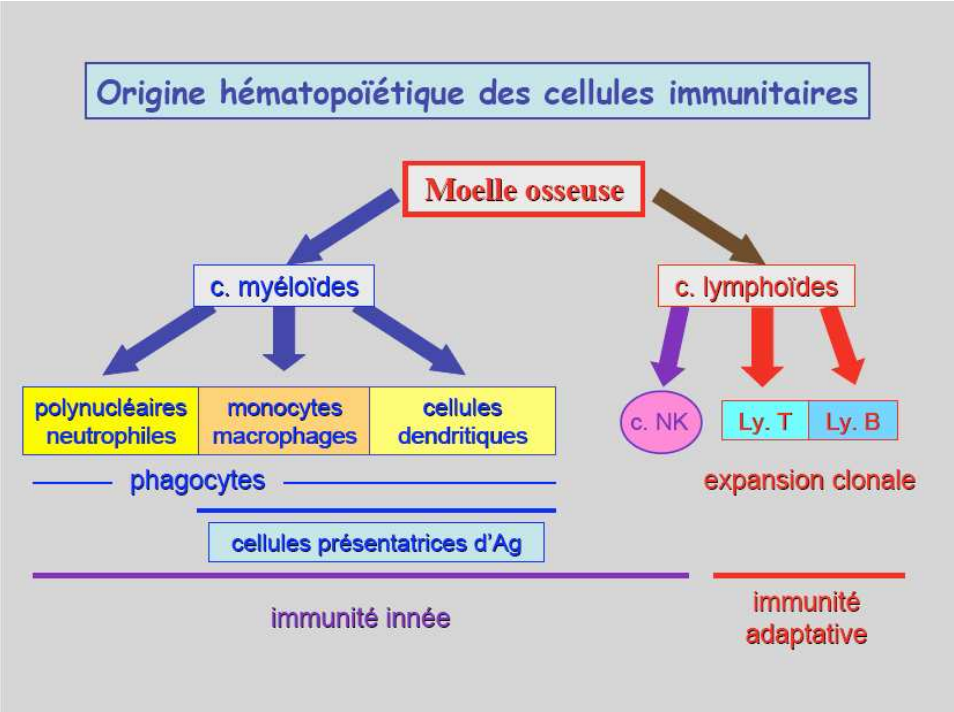


Fig. 7: Schéma représentant l'ensemble des acteurs majeurs du système immunitaire.

- **L'immunité adaptative**

La réponse innée permet d'éliminer 99,9% des infections dont 99% *via* les barrières de la peau et des muqueuses, mais pour les 0,1% restant, l'immunité adaptative est nécessaire. Il s'agit d'une réponse spécifique à un Ag faisant intervenir la mémoire immunitaire. La mise en place de cette réponse peut prendre quelques jours, elle est soit humorale (intervention des LB) soit cellulaire (intervention des LT $CD8^+$ et LT $CD4^+$).

Les principaux types cellulaires intervenant dans la réponse immunitaire adaptative sont les LT, les LB et les CPA. Suite à une interaction entre un Ag et un LB, ce dernier va se différencier en cellules filles B mémoires et plasmocytes sécréteurs d'Ac. Les Ac peuvent i) neutraliser la capacité des pathogènes à infecter les cellules cibles ; ii) augmenter la probabilité à l'agent étranger d'être phagocyté, et iii) collaborer avec le complément afin de faciliter la lyse des pathogènes.

Concernant les LT, ils reconnaissent les Ag uniquement s'ils sont associés au complexe majeur d'histocompatibilité présent à la surface des CPA. Ainsi activés ils vont se différencier en LT $CD4^+$ mémoires et LT $CD8^+$ cytotoxiques qui détectent et détruisent les agents pathogènes présents dans les cellules de l'hôte. Les cellules B et T mémoires vont permettre l'induction d'une réponse plus rapide lors d'une nouvelle attaque. La réponse immunitaire adaptative ainsi activée va induire par la libération de médiateurs chimiques une réponse immunitaire de type Th1, Th2, Th17 ou Treg.

La réponse Th1 est définie comme étant pro-inflammatoire : elle va engendrer la production de cytokines telles que l'IFN-γ. Quant à la réponse Th2, elle est considérée comme étant anti-inflammatoire et elle va induire la production de cytokines interleukine-4 (IL-4), IL-5, IL-10 ainsi que la production importante d'IgG, IgA et IgE. La réponse Th17 va réguler la production de cytokines IL-17 et IL-23 qui vont activer plus spécifiquement les neutrophiles, enfin la réponse Treg va induire la production de cytokines anti-inflammatoire IL-10 et transforming growth factor beta (TGF-β). (Fig. 8) (Medzhitov, 2007).

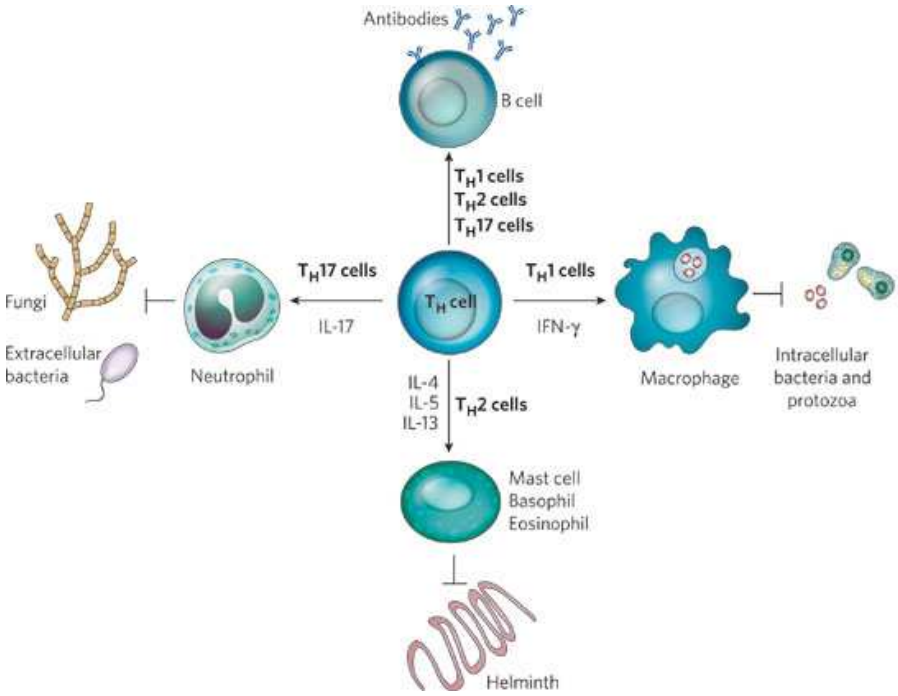


Fig. 8: Induction des voies Th1, Th2 et Th17 (Medzhitov, 2007).

Ces voies sont également modulées par la réponse innée *via* la production de cytokines par les macrophages, les CNK et les CD. Les profils des cytokines produits par les LT des groupes Th1 et Th2 se régulent mutuellement. L'équilibre des cytokines pro/anti-inflammatoires est très fragile : il arrive qu'elle soit perturbée et on peut alors assister à une inflammation chronique telle que celle observée dans les MICI.

- **Le système immunitaire intestinal**

Présentation générale

Le long des muqueuses du système digestif se situe les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse (MALT pour mucosa associated lymphoid tissue), on y retrouve de nombreux plasmocytes producteurs d'Ac. La muqueuse externe contient les LTIE, alors que dans la *lamina propria* on retrouve de nombreux follicules lymphoïdes contenant les cellules LB, les plasmocytes et les macrophages. Enfin, dans la sous-muqueuse les plaques de Peyers, nodules constitués de 30 à 40 follicules lymphoïdes, sont présentes (Fig. 9).

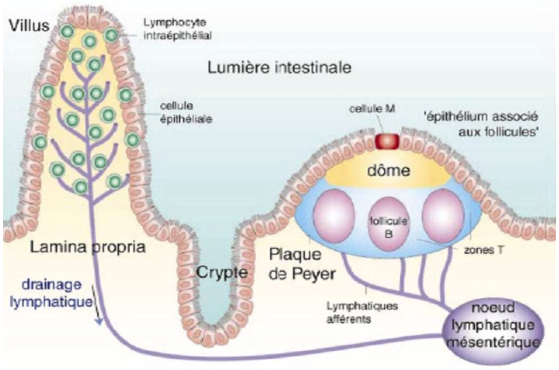


Fig. 9: Schéma représentant le SII.

Les cellules épithéliales jouent également un rôle important dans l'induction de la réponse immunitaire en délivrant de petits échantillons d'Ag étranger venant de la lumière aux MALT, ce transport d'Ag est effectué par des cellules spécialisées : les cellules M. Les cellules M sont des cellules épithéliales aplaties dépourvues de microvillosité qui présentent une invagination ou poche dans leurs membranes contenants des cellules B, des cellules T, des macrophages et des CD (Fig. 10). Les Ag ainsi transportés au sein des follicules lymphoïdes induisent la différenciation des LB en plasmocytes qui migrent le long de la sous-muqueuse produisant alors des IgA au sein de la lumière et induisent ainsi une réponse immunitaire de type Th1, Th2 ou Th17. Les Ag peuvent également être endocytés par des CPA dans le but d'induire la réponse immunitaire adaptative (Fig. 10).

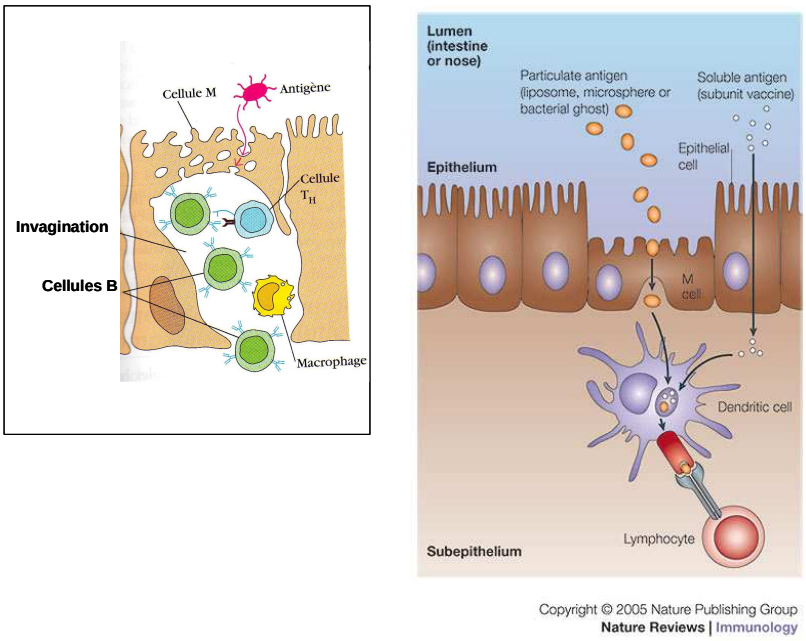


Fig. 10: A gauche : une cellule M intestinale ; A droite : transport d'Ag et présentation à un LT *via* une CPA.

Voie de signalisation « Patterns Recognition Receptor »

Les cellules de l'immunité innée telles que les phagocytes, reconnaissent les bactéries grâce aux « Patterns Recognition Receptor » (PRR). Les PRR représentent l'ensemble des récepteurs de surfaces Toll Like Receptor (TLR) ainsi que les récepteurs intra-cellulaires « Nod Like Receptor » (NOD). On a découvert 11 TLR chez l'homme, chacun de ces recepteurs reconnaissent spécifiquement un composant bactérien : le TLR-2, NOD-1, NOD-2 reconnaissent le peptidoglycane (PEG) des bactéries à Gram positif, le TLR-4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, le TLR-5 est spécifique des flagelles alors que le TLR-9 reconnaît les motifs Cytosine Phosphoryl Guanine (CpG) présents dans le génome bactérien (Rachmilewitz *et al.*, 2004) (Fig. 11).

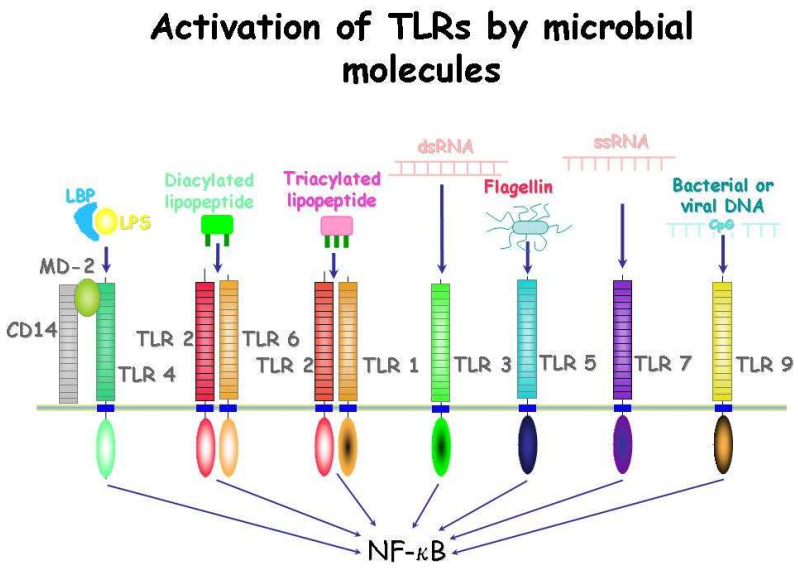


Fig. 11: Les TLR et les ligands associés.

L'association d'un PRR avec un ligand bactérien spécifique va induire l'activation de la protéine MyD88. Cette dernière va alors recruter l'IL-1 receptor associated kinase (IRAK) qui une fois autophosphorilé recrute le TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) qui active également un certain nombre de kinases dont le but étant de phosphoriler l'inhibiteur de NF-κB (IκB). IκB va alors être dégradé au sein du protéasome dans le cytoplasme permettant ainsi à NF-κB de transloquer dans le noyau et d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, ou encore le TNF-α conduisant alors à

l'activation de la réponse immune innée et / ou adaptative (Fig. 12) (Lee *et al*., 2007; Magalhaes *et al*., 2007; Medzhitov, 2007).

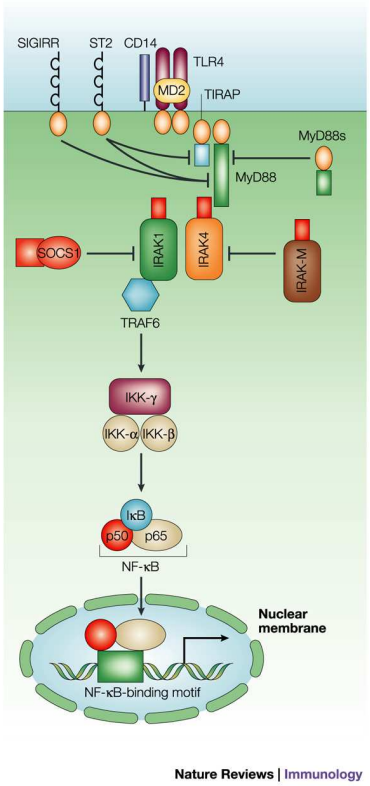


Fig. 12: Schéma représentant la cascade d'activation NF-κB *via* l'activation du TLR-4.

3) Dialogue bactéries hôte

L'Ecologie est la science des relations entre les êtres vivants et le monde qui les entoure (E. Haeckel 1834-1919).

A l'heure actuelle, nous savons que la présence du microbiote joue un rôle essentiel notamment dans la maturation du système immunitaire de l'hôte. Ces fonctions ont été mises en évidence par le biais d'études effectuées chez des souris conventionnelles en comparaison avec des souris sans germe ou axéniques. Ces travaux ont démontré que les souris axéniques possédaient un SII immature du fait de l'atrophie des cellules M et des plaques de Peyer et de la diminution de la sécrétion d'IgA et des cellules LT : l'ensemble atténuant la fonction de barrière intestinale (Macpherson and Harris, 2004). L'écosystème microbien est donc indispensable pour la santé de l'hôte, mais l'équilibre entre les deux est essentiel. Il est possible que dans certaines pathologies telles que les MICI, l'homéostasie soit perturbée et

que l'hôte réagisse de façon agressive en activant le système immunitaire de manière inhabituelle.

L'homéostasie, est donc un paramètre essentiel pour la santé de l'hôte. Un défaut de l'homéostasie peut alors provoquer une inflammation. Afin de comprendre comment un écosystème complexe tel que le microbiote peut se développer au sein même de notre corps sans éveiller notre système immunitaire, il est important de connaître comment s'établit ce dialogue bactéries-hôte. Les bactéries commensales se développent principalement dans la lumière du tube digestif et plus particulièrement dans le côlon. S'il arrive que des bactéries traversent la barrière mucosale et pénètrent dans la *lamina propria*, elles vont être éliminées par la première ligne de défense de l'organisme que sont les phagocytes. Dans le cas où elles parviennent à atteindre les plaques de Peyer, les bactéries peuvent alors interagir avec les cellules intestinales telles que les cellules M ou encore les CD. Grâces aux PRR, elles vont permettre d'activer certaines voies de transduction telle que la voie NF-κB et moduler ainsi la réponse immunitaire de l'hôte (Lee *et al*., 2007). Il a été récemment démontré que des bactéries commensales traversant la barrière épithéliale pouvait survivre quelques jours dans les CD, induisant la production d'IgA par ces dernières et leur interaction avec les LT/LB dans les plaques de Peyer. Ainsi activées, les cellules immunitaires induisent une réponse pro-inflammatoire et entraînent ainsi l'élimination d'autres bactéries potentiellement pathogènes présentes dans la *lamina propria* (Fig. 13) (Macpherson and Harris, 2004).

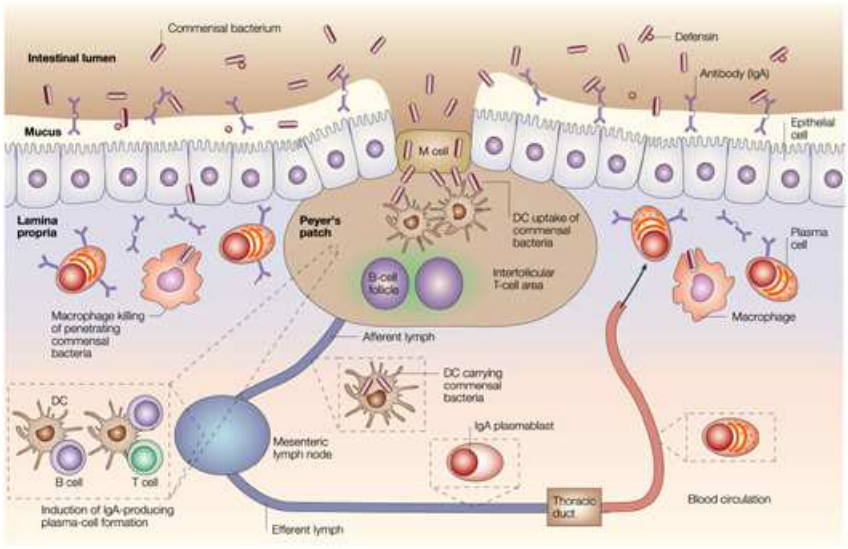


Fig. 13: Dialoque bactéries-hôte (MacPherson et Harris., 2004).

Le dialogue bactéries-hôte peut également s'effectuer par l'intermédiaire de molécules produites par le microbiote. Il a été récemment démontré que le butyrate produit par des bactéries commensales était capable de moduler la voie NF-κB en inhibant la dégradation de son inhibiteur IκB. Ainsi, la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-8, TNF-α) est diminuée et l'homéostasie est alors maintenue (Magalhaes *et al*., 2007).

L'environnement du TD est très complexe, il fait intervenir de nombreux paramètres tels que le microbiote et le SII. Il est intéressant de noter l'existence d'un paradoxe dans la composition du microbiote qui est spécifique à chaque individu tout en ayant des fonctions physiologiques identiques et ce, pour tous les individus. Une rupture dans l'équilibre fragile de cet écosystème enjendrerai des conséquences pour l'hôte telle que l'induction d'une inflammation anormal caractéristique des MICI dont nous allons aborder la description dans le prochain chapitre.

II. MICROBIOTE ET MICI

1) Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

- **Les mécanismes de l'inflammation**

La réaction inflammatoire peut être définie comme une réaction de défense de l'organisme non spécifique dirigée contre des agents agresseurs de nature infectieuse, chimique, physique ou encore auto-immune.

Lors de la réaction inflammatoire, les vaisseaux sanguins se dilatent par le processus de vasodilatation. Ce phénomène provoque rougeur et chaleur qui sont des signes cliniques de l'inflammation. Les vaisseaux sanguins dilatés deviennent plus perméables, causant ainsi l'œdème associé à l'inflammation. La migration des phagocytes se produit moins d'une heure après une infection. Les granulocytes arrivent en premier sur le site, attirés par chimiotaxie positive, puis les monocytes activés se transforment en macrophages qui vont participer à l'élimination des agents pathogènes et des débris cellulaires par la phagocytose. Le pus observé qui peut s'accumuler dans la zone infectée contient principalement les cellules mortes des phagocytes (Campbell, 1993).

Les MICI se caractérisent par une inflammation chronique atteignant principalement le TD. La formation d'infiltrats de cellules pro-inflammatoires va causer de nombreux dommages tissulaires et cellulaires au sein du TD caractéristiques des MICI dont les causes demeurent inconnues.
On distingue principalement deux MICI : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Il est parfois difficile lors des premières manifestations cliniques de savoir à laquelle des deux maladies on est confronté. Il existe cependant une différence fondamentale : l'inflammation observée dans la RCH atteint toujours le rectum et peut « remonter » sur le côlon, d'un seul tenant, sans laisser d'intervalle de muqueuse saine. Elle ne touche en aucun cas d'autres segments du TD alors que dans le cas de la MC, l'inflammation peut atteindre toutes les parties du TD (depuis la bouche jusqu'à l'anus) mais se situe préférentiellement sur la partie terminale de l'intestin grêle (iléon) et sur le côlon. La MC fut décrite pour la première fois en 1932 par Burril B. Crohn, médecin américain, qui lui a donné son nom suite à la description de 14 cas d'affection localisée au niveau de l'iléon. En ce qui

concerne l'épidémiologie, on compte aujourd'hui un nouveau cas par an pour 1000 habitants au sein des pays industrialisés (Fournet and Dhumeaux, 2001). A l'échelle mondiale, on peut observer une différence entre l'hémisphère nord et l'hémisphère sud. En effet, la maladie est plus fréquente en Europe et en Amérique du Nord, on retrouve également plus de cas en milieu urbain qu'en milieu rural. Le plus fréquemment, l'âge moyen des personnes atteintes se situe entre 15 et 30 ans (Société Nationale Française de Gastroenterologie, 1999a, b; Baumer, 2002).

- **Diagnostic et symptômes**

La MC ou la RCH sont des maladies difficiles à détecter, le diagnostic peut avoir lieu plusieurs mois voire plusieurs années après le début des symptômes (douleurs abdominales, diarrhées et perte de poids). La constatation des premiers signes cliniques doit être confirmée par un examen endoscopique (Fig. 14).

Dans le cas de la MC, les symptômes peuvent varier selon la gravité de l'inflammation. Lorsque celle-ci atteint l'iléon, le malade ressent des douleurs abdominales en début d'inflammation, accompagnées de diarrhées non sanglantes et d'une fièvre modérée. On observe alors une altération de l'état général de la personne (fatigue, perte de l'appétit). Lorsque le côlon est atteint, les diarrhées deviennent sanglantes et après plusieurs mois voire années, l'inflammation peut s'accompagner de complications et atteindre la zone ano-rectale, on observe alors l'apparition d'abcès, de fissures anales ou péri-anales qui sont la conséquence de l'évolution en profondeur des ulcérations qui entraînent alors une perforation.

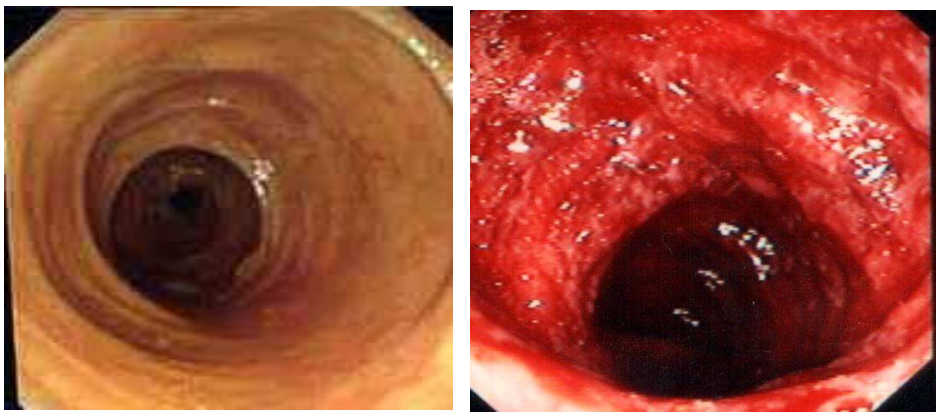


Fig. 14: Image d'endoscopie entre un côlon sain (à gauche) et un côlon enflammé d'un patient atteint d'une RCH (à droite).

Toujours dans le cas de la MC, des symptômes extra-digestifs peuvent se manifester et provoquer ainsi de l'arthrite et des infections (cutanées, buccales et oculaires) (Fig. 15). La plupart des symptômes décrits ne sont pas spécifiques des MICI et varient d'une personne à l'autre, d'où la difficulté de poser un diagnostic. Seule, son évolution chronique entraînant des épisodes de poussées aigues entrecoupées de périodes de remissions plus ou moins longues sont caractéristiques des MICI et permettent ainsi d'établir le diagnostic (Société Nationale Française de Gastroenterologie, 1999a, b; Baumer, 2002).

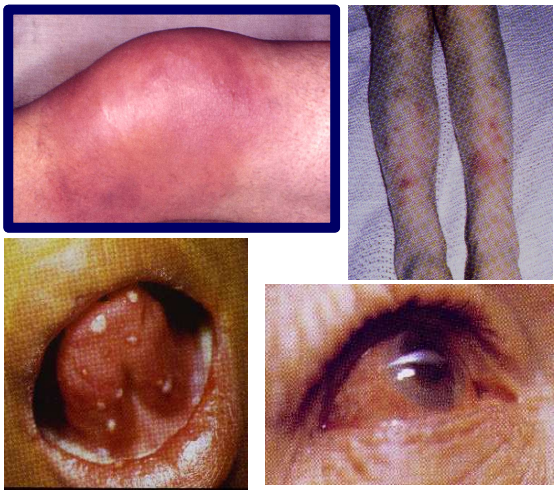


Fig. 15: Symptômes extra digestifs de la MC.

- **Causes et conséquences des MICI**

Les causes des MICI sont encore très peu connues, la difficulté majeure concerne l'interprétation des données qui montre de multiples perturbations biologiques lors d'une poussée dont on ne sait toujours pas à l'heure actuelle si elles sont « cause ou conséquence » de la maladie. On peut penser qu'une combinaison de facteurs environnementaux tels que la pollution et l'alimentation peut jouer un rôle notamment sur l'induction des poussées. D'autres facteurs tels que le tabac, augmente l'induction des poussées de la MC alors qu'il limite le développement de la RCH. La raison des effets contraires de ce facteur en fonction des deux types de maladie reste encore inconnue à ce jour (Société Nationale Française de Gastroenterologie, 1999a, b; Baumer, 2002).

D'un point de vue mécanistique, les MICI sont généralement associées à la présence de LT supérieure à la normale entraînant ainsi une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IFN-γ…) ayant pour conséquence un déséquilibre concernant la balance des

cytokines et induisant ainsi l'inflammation. Nous détaillerons dans le chapitre « Bactéries recombinantes et MICI » comment l'utilisation de bactéries produisant des cytokines anti-inflammatoires s'est avérée être efficace dans les cas de colites expérimentales.

Récemment, une nouvelle population de cellules LT, les Th-17 produisant l'IL-17 (cytokine pro-inflammatoire) et nécessitant l'intervention de l'IL-23 a été rapportée comme étant impliquée dans le développement de MICI chez l'homme ainsi que dans des modèles de colites expérimentales (Duerr *et al.*, 2006; Hue *et al.*, 2006; Kullberg *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2008; Schmechel *et al.*, 2008). Cette réponse pro-inflammatoire est contrebalancée par une autre population de cellules LT, les LT régulateurs (Treg) (Fontenot and Rudensky, 2005) qui vont induire la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou l'IL-35. En d'autres termes, il existe un équilibre fragile entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires. Ces médiateurs vont permettre de gérer l'induction, la perpétuation ou l'arrêt de l'inflammation. Lorsque cet équilibre est modifié notamment par l'intervention du microbiote (comme on l'étudiera dans le chapitre « Rôle du microbiote au sein des MICI », on peut s'attendre à voir apparaître un dysfonctionnement du système immunitaire entraînant ainsi une inflammation. Le déséquilibre existant entre la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires n'est pas le seul facteur physiologique intervenant dans le développement des MICI. En effet, l'observation de plusieurs cas cliniques au sein de mêmes familles a mis en avant l'hypothèse d'un facteur génétique : de récentes études ont alors mis en évidence la présence de mutations de certains gènes dans le cas de la MC dont le plus connu est la mutation du gène NOD 2 ou CARD 15 située sur le chromosome 16 (Hugot *et al.*, 2001). Toutefois, ces facteurs génétiques ne sont pas des causes exclusives de la maladie et ne permettent pas de déterminer une population à haut risque. Nous détaillerons plus tard le rôle du microbiote sur le développement des MICI, en effet une dysbiose du microbiote ou la présence d'agent infectieux ont été démontrée chez de nombreux patients, mais là encore il est difficile de déterminer si les observations sont la cause ou la conséquence de la maladie. Enfin, un mauvais fonctionnement du système immunitaire peut aussi être mis en cause (Fiocchi, 2005).

Les conséquences majeures de cette maladie sont la malnutrition et l'anémie. En ce qui concerne la MC, 37% des personnes atteintes devront subir une intervention chirurgicale après 5 ans, 66% après 15 ans de maladie. La durée des périodes de rémission est en moyenne de 2 ans mais l'extrême variabilité évolutive des MICI ne permet pas de donner un réel

pronostic. Cinq à 15% des personnes atteintes meurent d'une septicémie, de dénutrition, du cancer du côlon ou encore d'une perforation intestinale (Baumer, 2002).

- **Objectifs des traitements actuels**

L'objectif des traitements actuels contre les MICI est d'induire une rémission pérenne de la maladie, de cicatriser la muqueuse, de restaurer et de maintenir l'état nutritionnel, d'obtenir une qualité de vie correcte et enfin d'optimiser la date d'intervention pour les malades nécessitant une chirurgie (Rutgeerts and Colombel, 1999). On peut distinguer deux types de traitements i) les traitements à visées symptomatiques, dont le but est d'agir sur la diminution des symptômes eux-mêmes, cela afin de soulager la survenue des crises aux patients et ii) les traitements à visées curatives, qui ciblent plus précisément les mécanismes d'action et l'origine des MICI mais qui à ce jour sont uniquement suspensifs.

Les traitements à visées symptomatiques

Ils comprennent le repos, une alimentation saine et la prise d'anti-diarrhéiques et anti-spamodiques. On peut ajouter à cela des approches non conventionnelles telles que des approches psychothérapeutiques afin de maîtriser le stress qui peut favoriser l'apparition de crises (Frexinos J *et al.*, 2003) ou encore la prise de probiotiques dont on détaillera les effets dans le chapitre « Probiotiques et MICI »

Les traitements à visées curatives

Ils sont basés sur la prise de corticoïdes, qui est couramment utilisée lors de poussées aigües de la maladie: ils permettent de diminuer l'inflammation en diminuant la production de TNF-α. L'utilisation de ces corticoïdes reste limitée car de nombreux malades présentent une cortico-résistance (le traitement n'a alors plus d'effet) ou une cortico-dépendance (l'arrêt du traitement devient alors impossible car il entraîne aussitôt une rechute de la maladie) (Rutgeerts and Colombel, 1999). Lorsqu'une infection apparaît, l'utilisation d'antibiotiques est recommandée. L'action des immunosuppresseurs qui régulent la prolifération des LT, des macrophages, des monocytes et diminue la production de TNF-α peut être bénéfique mais malheureusement leurs actions ne sont pas spécifiques et ils peuvent engendrer des effets secondaires indésirables (Lemann, 1998; Colombel, 1999). Enfin, la prise d'immunorégulateurs qui contrôlent la production de cytokines peut également être

préconisée (Rutgeerts and Colombel, 1999) mais dans ce cas, une surveillance sur la formulation sanguine s'impose car les effets secondaires entraînent des modifications du taux des globules rouges, des globules blanc et des plaquettes. Dans le cas de la MC, lorsqu'apparaissent des complications telles que des abcès et des fistules, une opération chirurgicale peut devenir nécessaire mais elle ne guérira en rien cette maladie chronique.

On peut donc conclure que tous les traitements actuels ne sont que suspensifs et ne permettent pas une guérison complète de la personne atteinte de MICI. Ainsi, de nombreux travaux actuellement en cours dans ce domaine ont pour but de trouver un traitement plus satisfaisant, qui permettrait d'une part, de diminuer les symptômes en évitant les effets secondaires et d'autre part, de trouver une voie de guérison.

2) Le stress oxydant et les MICI

- **Généralités**

Le stress oxydant se caractérise par un déséquilibre entre la quantité des DAO présents dans l'environnement et les systèmes de défense de l'organisme. Les DAO sont des composés moléculaires toxiques dérivés de l'oxygène, parmi lesquels on retrouve l'ion superoxyde ($O_2^{\circ\cdot}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore le radical hydroxyle (OH°).

Les sources de production des DAO sont diverses puisqu'on y retrouve i) les enzymes de la chaîne respiratoire où l'oxygène est réduit en H_2O; lors de cette réduction, une partie des intermédiaires réactionnels ($O_2^{\circ\cdot}$ / H_2O_2) vont être détournés de la réaction de réduction et forment ainsi des DAO (Imlay and Fridovich, 1991) ; ii) l'intervention de certains facteurs exogènes tels que le fer et le cuivre, qui peuvent agir comme catalyseur et favoriser l'apparition des DAO, c'est notamment le cas lors de la réaction de Fenton (Park and Imlay, 2003), et iii) les infiltrats de cellules phagocytaires, qui restent le facteur de formation des DAO le plus important dans le cadre des MICI. Il a été démontré, l'existence d'une poussée oxydante (respiratory burst) qui a lieu pendant et après la phagocytose, uniquement en présence d'un microorganisme permettant ainsi de le combattre (Roos, 1991). Cette poussée oxydante, est la résultante de l'activation de certaines enzymes situées au sein même des phagocytes, telles que la NADPH oxydase, la NO synthase (NOS) ou encore la

myéloperoxydase (MPO) fréquemment utilisée comme marqueur du stress oxydant dans les colites (Fig. 16).

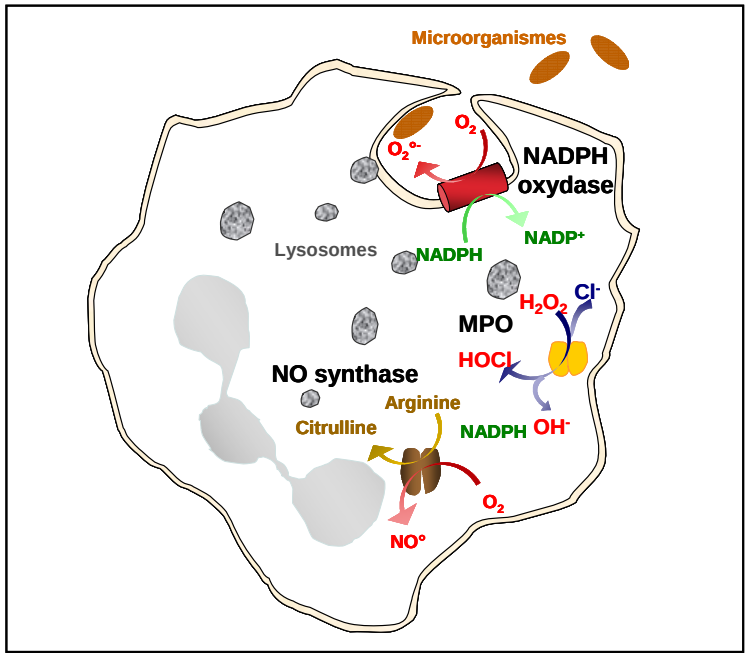


Fig. 16: Production de DAO par les enzymes NOS, NADPH et MPO présentes dans les phagocytes (Rochat et al., 2007).

La toxicité des DAO vis-à-vis des composants cellulaires n'est plus à démontrer : $O_2^{\circ\cdot}$ inactive les enzymes par la réduction des métaux de transition (Flint *et al.*, 1993), provoque une auxotrophie des acides aminés aromatiques (Benov and Fridovich, 1999) et déstructure les protéines, enfin, il intervient dans la formation de OH° nettement plus toxique pour la cellule. H_2O_2 inhibe la croissance cellulaire (Seaver and Imlay, 2001) et OH°, considéré comme le plus nocif, oxyde les acides nucléiques, induisant ainsi des mutations ayant pour conséquence la modification de l'ADN (Farr and Kogoma, 1991) et peroxyde les lipides entraînant l'altération des protéines membranaires (Farr and Kogoma, 1991).

La toxicité des DAO vis-à-vis de la cellule dépend également de leurs capacités à diffuser à travers cette dernière, en effet $O_2^{\circ\cdot}$ reste particulièrement toxique car il ne peut traverser les barrières biologiques (Hassan and Fridovich, 1979) contrairement à H_2O_2 qui peut diffuser à travers les membranes diminuant la concentration intra-cellulaire des DAO et atténuant ainsi leurs toxicités. Concernant OH°, sa durée de vie n'est pas suffisamment longue pour lui permettre de diffuser à plus de quelques nanomètres de distance du lieu de sa formation (Farr and Kogoma, 1991).

- **Les enzymes anti-oxydantes**

La toxicité de l'oxygène ne se développe que si le stress oxydant est supérieur au système de défense cellulaire. Parmi ces systèmes de défense, on retrouve les enzymes anti-oxydantes telles que la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD).
Trois isoformes de la SOD ont été identifiées chez l'homme : la SOD cuivre/zinc (Cu/Zn SOD), la SOD à manganèse (MnSOD) et la SOD extra cellulaire (EC-SOD). Les deux premiers isoformes sont plus particulièrement exprimés par les neutrophiles et les macrophages alors que la troisième est localisée dans les petits vaisseaux de l'épithélium ainsi que les neutrophiles (Zelko *et al*., 2002; Kruidenier *et al*., 2003c).

Mode d'action des enzymes anti-oxydantes

D'un point de vue biochimique, la SOD convertit l'O_2° en H_2O_2 qui lui-même est converti en eau par la CAT mais d'autres rôles leur sont attribués notamment dans la régulation des infiltrats lymphocytaires pouvant avoir lieu pendant un phénomène inflammatoire (Fig. 17). Il a été démontré que MnSOD inhibe l'infiltration des neutrophiles *in vitro* (Hardy *et al.*, 1994) ; cette observation a par la suite été confirmée *in vivo* dans un modèle murin de colite induite par de l'acide acétique (Weiss *et al*., 1996).

Il a été récemment démontré que des cellules mononucléaires obtenues à partir de souris transgéniques surexprimant Cu/Zn SOD et la CAT inhibent leurs interactions avec les cellules endothéliales *in vitro* en comparaison avec les cellules mononuclées issus de souris sauvages, ce qui indiquerait que ces enzymes jouent un rôle dans la régulation de l'infiltration de cellules mononuclées *via* la diminution de l'expression des molécules d'adhésion telle que ICAM-1(Yang *et al.*, 2003).

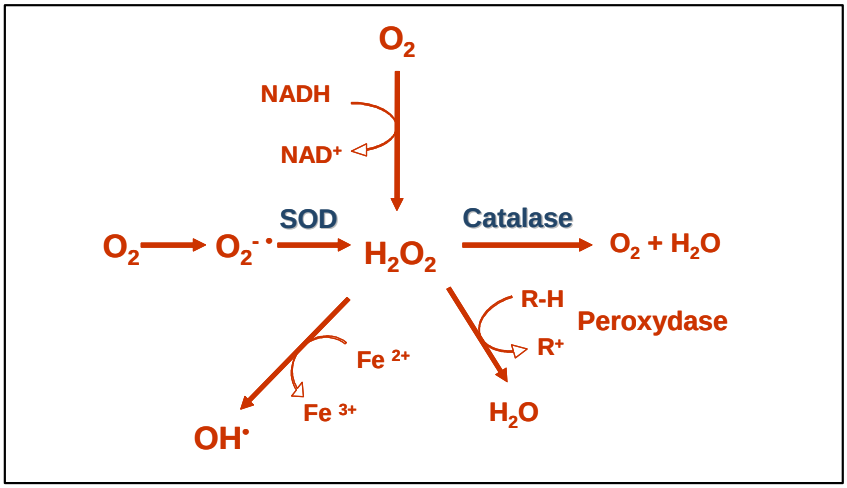


Fig. 17: Mode d'action des enzymes antioxydantes sur la formation des DAO lors de la dégradation de l'oxygène.

Le stress oxydant et les bactéries lactiques

Les bactéries ont également besoin de développer des systèmes antioxydants afin de lutter contre les dérivés toxiques de l'oxygène. La présence de SOD a été identifiée chez *L. lactis*, *Enterococcus faecalis* et *Aerococcus viridans*. Chez d'autres BL telles que *Lb. plantarum*, *Lb. casei* ou encore *Lb. fermentum*, la SOD est remplacée par une concentration élevée de manganèse capable d'éliminer $O_2^{\circ\cdot}$ (Archibald and Fridovich, 1981). Enfin, chez certaines souches telles que *Lb. casei* ATCC334, la présence du gène *sodA* dans le génome a été mise en évidence sans pour autant que la SOD soit exprimée. En ce qui concerne la CAT, sa présence chez les BL n'est pas évidente, une CAT à manganèse a été identifiée chez *Lb. plantarum* ATCC14431 (Kono and Fridovich, 1983). Certains gènes codant pour des CAT héminiques ont également été identifiés chez les BL mais ces dernières restent inactives sans apport d'hème au sein du milieu extérieur (Mares *et al.*, 1994; Abriouel *et al.*, 2004).

- **DAO et MICI**

Les DAO en faible quantité participent i) à la première ligne de défense contre les pathogènes *via l*eur potentiel bactéricide; ii) à la régulation de l'inflammation et iii) au maintien de l'homéostasie. Mais en quantité importante, ils peuvent induire une toxicité vis-à-vis des cellules et perpétuer l'inflammation. Leurs rôles au sein du développement des MICI ont été mis en évidence dans divers travaux.

La pathogénicité des MICI telles que la perméabilité de la muqueuse intestinale et la

déstructuration des cellules épithéliales a été corrélée avec l'augmentation de la présence de H_2O_2 dans l'environnement (Grisham *et al.*, 1990). De même, l'augmentation de NO (enzyme de production des DAO) est corrélée aux dommages oxydants observés au sein de la muqueuse enflammée ainsi qu'à la sévérité des MICI (Keshavarzian *et al.*, 2003). Ces observations indiquent que la production de DAO chez les patients atteints de MICI *via* l'activation des neutrophiles joue probablement un rôle dans la pathogénicité (Simmonds *et al.*, 1992).

De plus, un déséquilibre entre la production des DAO et la réponse anti-oxydante de l'organisme a été identifié chez des patients atteints de MICI (Mulder *et al.*, 1991; Lih-Brody *et al.*, 1996; Tuzun *et al.*, 2002). Ce phénomène contribue au processus de l'inflammation et de la pathogénicité observée (Kruidenier *et al*., 2003a). Une seconde étude menée par Kruidenier *et al.*, en 2003 a permis d'observer la diminution de l'expression des deux isoformes Cu/Zn SOD et EC-SOD ainsi que l'augmentation de MnSOD sous une forme inactive au sein des biopsies de patients atteint de MICI (Kruidenier *et al*., 2003c). L'incapacité des systèmes de défense antioxydant couplée à une surproduction de DAO peut donc expliquer le rôle probable du stress oxydant au sein des MICI.

Au vu de ces paramètres, plusieurs travaux ont été effectués utilisant la SOD comme traitement pour diminuer l'inflammation. Ses effets positifs ont été démontrés sur différents modèles de colites animales: La SOD humaine Cu/Zn SOD permet de diminuer les colites modérées induites par du Dextran Sodium Sulfate (DSS) mais n'agit pas sur des colites sévères (Kruidenier *et al*., 2003b). De même, l'administration de Cu/Zn SOD par voie sous-cutanée à des rats diminue une colite induite au Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) *via* la réduction du facteur d'adhésion VCAM-1 et du recrutement de leucocytes dans l'intestin grêle (Segui *et al.*, 2004). Son rôle concernant la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1-β, TNF-α) a également été démontré (Cuzzocrea *et al.*, 2001). Enfin, les effets positifs de la SOD ont été constatés sur des modèles de colites induites par de l'acide acétique (Keshavarzian *et al.*, 1990).

Quelques essais chez l'homme ont été réalisés, par l'administration de SOD dans des capsules de liposomes afin de traiter les désordres générés par des DAO (Niwa *et al.*, 1985). Un essai clinique de phase II mené sur 26 patients atteint de la MC sévère a révélé des résultats encourageants concernant un traitement à base de Cu/Zn SOD d'origine bovine, pour autant, les résultats n'ont pas été confirmés (Emerit *et al.*, 1991).

Les enzymes anti-oxydantes ont ainsi démontré leurs effets sur la diminution du stress oxydant ainsi que sur les colites animales et humaines. Les objectifs thérapeutiques utilisant ces enzymes sont limités par la durée de vie extrêmement courte après une injection par voie intraveineuse: 23 min pour la CAT et seulement 6 min pour la SOD (Turrens *et al.*, 1984). Pour autant, la stratégie consistant à augmenter l'apport en enzymes anti-oxydantes dans l'organisme de patients atteint de MICI n'est pas à exclure. Il est aujourd'hui possible grâce au génie génétique, d'utiliser des bactéries recombinantes afin de délivrer ces enzymes *in situ* et ainsi augmenter leur efficacité. Nous détaillerons dans le chapitre « Bactéries recombinantes et MICI » divers travaux qui ont été développés en utilisant des BL génétiquement modifiées (BLGM) pour produire une MnSOD ou une MnCAT (Han *et al*., 2006; Carroll *et al*., 2007; Rochat *et al*., 2007).

3) Rôle du microbiote au sein des MICI

Diverses observations au sein du milieu médical ont suggéré que le microbiote pouvait jouer un rôle dans le développement des MICI. En effet, de nombreuses personnes atteintes de ces maladies répondent favorablement à un traitement aux antibiotiques. Par ailleurs, un plus haut niveau d'anticorps dirigé contre des bactéries commensales a été identifié chez des personnes atteintes *vs* des personnes saines (Macpherson *et al*., 1996; Elson, 2000; Tannock, 2002). Enfin, les lésions inflammatoires les plus prononcées se situent principalement dans les régions de l'intestin qui contiennent le plus de bactéries. De plus, l'inflammation intestinale est absente ou sévèrement affaiblie chez des animaux axéniques, ce qui indique que le microbiote doit être présent pour induire une inflammation (Elson *et al*., 1995; Sartor, 1995). Ces résultats suggerent que la présence du microbiote est un élément essentiel intervenant dans le développement et la chronicité de l'inflammation (Desreumaux and Rousseaux, 2004).

Toutes ces observations ont donc amené les chercheurs à travailler sur le rôle du microbiote dans les MICI et il a été démontré qu'il existait une dysbiose du microbiote entre les individus sains et malades.

Le microbiote se compose de trois catégories de bactéries :
- **des bactéries symbiotiques**, qui exercent des fonctions bénéfiques pour la santé de l'hôte,
- **des bactéries commensales**, bactéries résidantes n'ayant aucun effet sur l'évolution de

l'hôte,

- **des bactéries opportunistes,** qui résident de façon permanente dans l'écosystème bactérien mais qui, en fonction de l'environnement peuvent s'avérer pathogènes pour l'hôte.

Ces trois types de bactéries permettent par leur action sur l'hôte, de maintenir l'homéostasie intestinale. En cas de dysbiose, nous observons une diminution de bactéries symbiotiques permettant aux bactéries opportunistes de se développer et d'induire une inflammation non spécifique. Cette inflammation peut chez certains individus prédisposés, conduire à une inflammation aigüe caractéristique des MICI (Fig. 18).

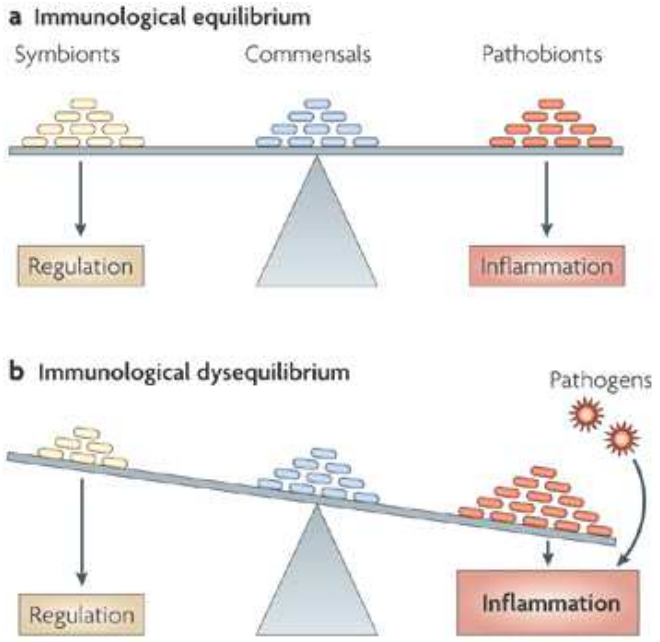


Fig. 18: Schéma représentant la dysbiose du microbiote (Round and Mazmanian, 2009).

L'analyse du microbiote associé à la muqueuse de patients atteint de MICI démontre une augmentation de la concentration bactérienne en comparaison avec des sujets sains. Cette observation est vraisemblablement corrélée avec une déficience de l'effet barrière observée lors des MICI, permettant ainsi aux bactéries présentes dans la lumière de se retrouver au sein même de la muqueuse (Harper *et al.*, 1985; Swidsinski *et al.*, 2005; Conte *et al.*, 2006). L'ensemble des études effectués sur la composition du microbiote fécal entre les individus sains et malades démontre donc une diminution notable de la biodiversité bactérienne

caractérisée par une diminution du *phylum* Firmicutes, des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* mais également de l'augmentation des Enterobactéries (Hartley *et al*., 1992).

En effet, des travaux menés par Sokol *et al.*, sur la comparaison des microbiotes de patients atteints de MC et de RCH avec des sujets sain a démontré l'existence d'un trou phylogénétique indiquant une diminution de la biodiversité du microbiote des patients. Les sondes utilisées afin d'étudier le microbiote ont couvert uniquement 50% et 65% du microbiote des patients atteints respectivement d'une RCH et d'une MC contre 80% pour les personnes saines (Sokol *et al*., 2006), les travaux effectués démontrent également la diminution du *phylum* Firmicutes et en particulier des groupes *Cl. coccoides* et *Cl. Leptum*. Ces derniers, ont la particularité de contenir de nombreuses espèces bactériennes ayant la capacité de produire du butyrate, source d'énergie des cellules épithéliales coliques et suspecté d'avoir des effets immuno-modulateurs. Ces observations ont été confirmées dans une seconde étude où la diminution de l'espèce *F. prausnitzii* appartenant au groupe *Cl. Leptum* a été observée (Sokol *et al*., 2009). La diminution du genre *Lactobacillus* a également été rapportée dans plusieurs travaux, or il s'agit d'un genre connu pour ces actions bénéfiques sur l'hôte dont de nombreuses souches sont considérées comme probiotiques (Favier *et al*., 1997).

Concernant les autres *phyla* du TD, il a été observé une diminution du genre *Bifidobacterium*, appartenant au *phylum Actinobacteria*, connu également pour ces effets probiotiques ainsi qu'une augmentation de l'espèce *B. ovatus* appartenant au *phylum Bacteroidetes* mais également de l'éspèce *E. coli* appartenant au *phylum Proteobacteria* (Fig. 19).

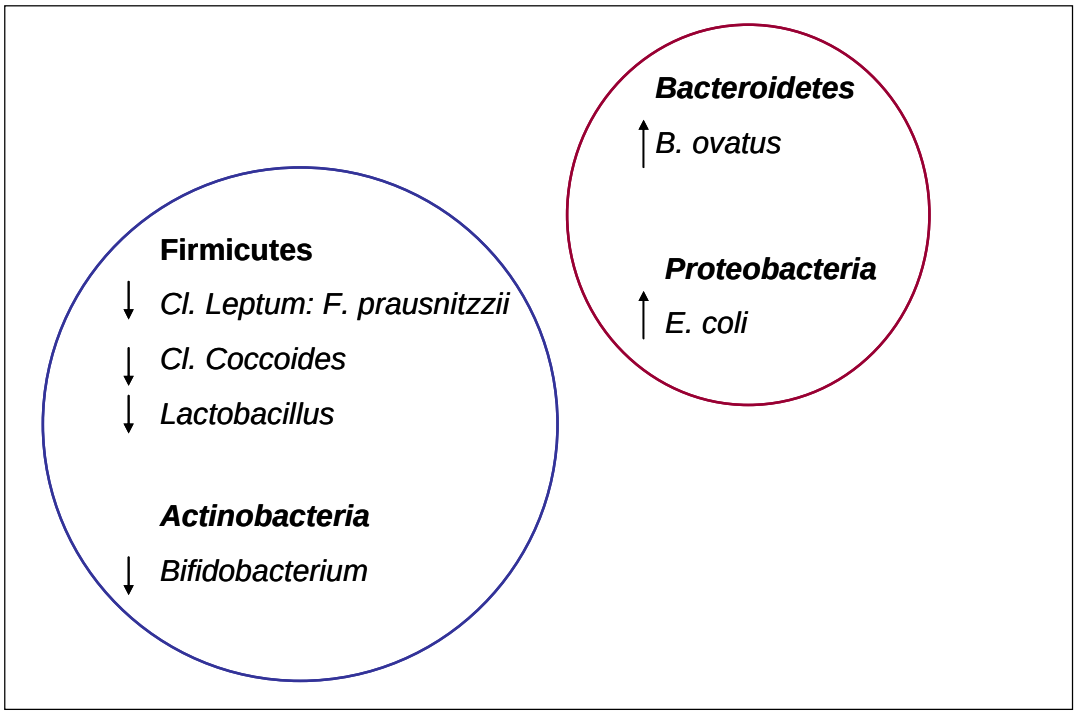


Fig. 19: Schéma représentant la dysbiose observée dans le microbiote fécal des patients atteints de MICI.

L'existance d'une dysbiose présente lors d'une inflammation n'est donc plus a démontrer, mais en est-elle la cause ou la conséquence ?

L'analyse du microbiote fecal de patient atteints de MICI à démontré d'une manière générale une instabilité de ce dernier entre les périodes de rémission et les périodes de crises (Scanlan *et al*., 2006). Cette observation indique que certaines bactéries commensales ont la capacité de moduler le système immunitaire afin de réguler l'inflammation.

Les travaux de Takaishi *et al*., qui ont montré une diminution du groupe *Cl. leptum* chez des patients atteints de colite ulcéreuse active en comparaison avec des personnes atteintes de cette même pathologie en rémission (Takaishi, 2007) permettent de confirmer l'existence des effets immuno-modulateurs de ce groupe maintenant un état de rémission chez des personnes atteintes de MICI. Il a été récement démontré des effets anti-inflammatoires de la bactérie commensale *F. prausnitzii* (Sokol *et al*., 2008) (Fig. 20). En effet, l'administration intragastrique de *F. prausnitzii* et de son surnageant a permis de diminuer significativement des colites induites au TNBS chez des souris. Enfin, les travaux effectuée sur différents modèles *in vitro* ont démontré que l'action de cette souche pouvait provenir d'un composé produit par la bactérie ayant un effet sur l'inactivation de la voie NF-kB entraînant un blocage

de la voie Th1 et donc une diminution des cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules intestinales de l'hôte.



Fig. 20: *Faecalibacterium prausnitzii*, microscope (x1000) (Watterlot., 2008; UEPSD-INRA).

Nous savons que la composition du microbiote peut donc influencer le développement du système immunitaire ou prédisposer un individu à développer des MICI. Le style de vie, les pratiques médicales (vaccins), la susceptibilité génétique ou encore l'exposition aux microorganismes par le biais de l'allaitement et de l'hygiène, peuvent être des facteurs intervenant dans la dysbiose du microbiote et être responsable indirectement du développement de l'inflammation (Round and Mazmanian, 2009). Le stress et la nourriture peuvent également influencer la composition du microbiote, de même que la prise d'antibiotiques, qui agit indistinctement sur les organismes symbiotiques et opportunistes. Pourtant, une autre hypothèse sur l'existence de la dysbiose observée lors des MICI est également probable. Il est possible que la présence d'une inflammation causée par d'autres paramètres puisse provoquer un déséquilibre de la flore en faveur des opportunistes. Dans ce cas, la dysbiose de l'écosystème intestinal n'est plus responsable du développement de l'inflammation mais en devient une des conséquences (Round and Mazmanian, 2009).

Enfin, il a été démontré que des bactéries commensales peuvent activer les récepteurs spécifiques des Ag des bactéries pathogènes des cellules LT et ainsi causer l'inflammation sur un sujet génétiquement susceptible (Sartor, 2009).

Les bactéries commensales font donc partie des facteurs influençant le développement des MICI, mais il est encore difficile à l'heure actuelle de définir précisément leurs rôles. De même que la dysbiose observée au sein du microbiote intestinal peut favoriser le développement des bactéries opportunistes, elle peut également influencer la colonisation de

certaines bactéries pathogènes qui elles-mêmes peuvent induire ou maintenir une inflammation.

4) Rôle des bactéries pathogènes au sein des MICI

L'hypothèse concernant l'intervention des bactéries pathogènes dans l'induction et la perpétuation de l'inflammation est basée sur diverses observations : i) les symptômes de la MC semble coïncider avec les symptômes observés après une infection virale ou bactérienne ; ii) les poussées semblent diminuer après la prise de traitement antibiotique ou de lavage intestinal et iii) les mutations des recepteurs NOD2 et des gènes impliqués dans l'autophagie (ATG16L1, IRGM) ont été observés chez les patients atteints de MICI (Hampe *et al*., 2007; Parkes *et al*., 2007; Rioux *et al*., 2007). Ces mutations rendent les cellules eucaryotes en incapacité de contrôler la multiplication des bactéries invasives. Tous ces paramètres amènent donc à penser qu'un germe pathogène tel que *E. coli* adhérent invasif (AIEC) ou *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) joue probablement un rôle important dans le développement de la maladie.

- **Rôle d'*Escherichia coli* adhérents invasifs dans le développement des MICI**

Nous avons vu précédemment que la dysbiose observée chez des patients atteints de MICI se caractérise notamment par l'augmentation de certaines proteobactéries telles qu'*E. coli*.
De nombreuses recherches ont permis de mettre en avant le rôle potentiel de souches adhérentes invasives d'*E. coli* au sein des MICI. En effet, les souches d'AIEC ont été isolées de lésions iléales chez environ 36% des patients atteints de la MC après chirurgie contre 6% chez des personnes saines (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). On les retrouve également dans des lésions naissantes de l'inflammation ce qui peut indiquer qu'elles participent à son induction. Enfin, une analyse phylogénétique de 36 souches d'AIEC associées à des MC, à montré que les souches étaient capables de prendre l'avantage dans un environnement inflammatoire (Sepehri *et al.*, 2009).

La capacité des AIEC à coloniser anormalement la muqueuse iléale chez des patients atteints de la MC provient notamment de leur capacité à adhérer aux entérocytes. En effet, contrairement aux *E. coli* commensaux, les AIEC expriment des pilli de type 1 qui leurs permettent d'augmenter l'adhésion bactérienne à la bordure en brosse des entérocytes iléaux.

De plus, les AIEC sont capables de traverser la barrière intestinale et d'entrer ainsi en contact avec les macrophages dans lesquels ils sont capables de se répliquer et d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires. Enfin, il a été récemment démontré l'augmentation de l'expression du récepteur CEACAM6 (récepteur des pilli de type 1 des *E. coli* AIEC) sur les cellules épithéliales. Des travaux effectués chez des souris transgéniques ont également permis de démontré que l'induction de la colite était dépendante des pilli de type 1 ainsi que du récepteur CEACAM6 (Carvalho *et al.*, 2009). De plus, ce dernier n'est pas exprimé par les cellules épithéliales de personnes saines (Scholzel *et al.*, 2000), la surexpression de CEACAM6 peut être dûe soit à une stimulation directe par des bactéries pathogènes telles que AIEC, soit à une stimulation indirecte par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α qui est produit par les macrophages colonisés par AIEC. De même que pour la dysbiose du microbiote, nous ne pouvons pas à l'aide des connaissances actuelles affirmer si la surexpression de CEACAM6 et la colonisation anormale des AIEC chez les patients atteints de la MC sont des causes ou des conséquences de l'inflammation. La surexpression de CEACAM6 est-elle due à la présence de AIEC, ou la colonisation de AIEC est-elle une conséquence de la surexpression du récepteur ? Les travaux menés par Barnish *et al.*, en 2007 ont démontré qu'une infection causée par AIEC sur des cellules épithéliales *in vitro* entraîne une augmentation de l'expression de CEACAM6 ce qui indiquerait que AIEC est capable de promouvoir sa propre colonisation (Barnich *et al.*, 2007). Une expression basale de CEACAM6 a été observée dans l'iléon de la majorité des patients contrairement à des individus sains, ce qui suggèrerait que ce n'est pas une conséquence, mais que ces patients sont prédisposés génétiquement à la surexpression de cette molécule et sont donc des personnes à risques pour développer une infection causée par AIEC et ainsi prédisposés à développer des MICI.

Un autre facteur peut entrer en jeu dans la colonisation des AIEC mettant en cause une rupture de la barrière intestinale. Cette dernière, comprend des cellules épithéliales différenciées qui sépare la lumière contenant les microorganismes de la muqueuse. Une brèche dans l'intégrité de la barrière permet la pénétration d'Ag et de microbes qui vont stimuler une réponse pro-inflammatoire puis potentiellement induire une MICI. Il a été montré que la structure et la fonction des jonctions apicales complexes sont défectueuses chez les patients atteints de MICI ainsi que chez des modèles animaux (Bruewer *et al.*, 2006; Weber and Turner, 2007; Xavier and Podolsky, 2007). Ce dysfonctionnement de la barrière intestinale augmenterait la perméabilité, or, une étude récente a démontré que AIEC était

capable de perturber les jonctions complexes apicales des cellules épithéliales mononucléaires MDCK-1 polarisées et joue donc un rôle supplémentaire dans l'induction de l'inflammation en participant à la rupture de l'intégrité de la barrière intestinale (Wine *et al.*, 2009) (Fig. 21).

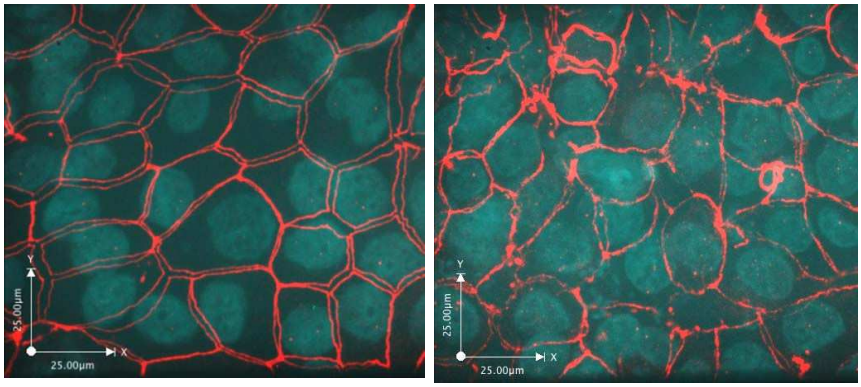


Fig. 21: Jonctions complexes apicales de cellules épithéliales mononucléaires MDCK-1 saines (à gauche) et infectées par AIEC (à droite) (Wine et al., 2009).

- **Rôle de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* dans le développement des MICI**

AIEC n'est pas le seul organisme pathogène qui semble intervenir dans le développement des MICI : de nombreuses recherches ont ainsi permis d'associer la présence de l'organisme MAP avec le développement de la MC. MAP est un organisme opportuniste, largement présent dans notre environnement, on le retrouve notamment dans l'alimentation tel que le lait pasteurisé (Ellingson *et al.*, 2005), les réserves d'eau potable (Mishina *et al.*, 1996) mais également chez le bétail où il est considéré comme un organisme zoonotique (Greenstein and Collins, 2004). L'hypothèse mettant en scène le rôle de MAP dans les MICI a été initiée par Daziel qui relia en 1913, les symptômes de la MC avec ceux d'une infection intestinale chronique chez les bovins. Cette hypothèse s'est renforcée lorsque la présence de MAP a été confirmée au sein de granulomes isolés de patients atteints de la MC (Chiodini *et al*., 1984a; Chiodini *et al*., 1984b). D'autres études ont prouvé qu'il existait une relation entre la présence de MAP et le développement des maladies. Une analyse sanguine effectuée sur 222 patients atteints de MCI en comparaison avec 80 sujets contrôles a permis de montrer qu'il existait une association entre MAP et la réponse immunitaire (Juste *et al.*, 2009). La présence de MAP dans le lait humain ainsi que dans le sang de patients a également été identifiée (Naser *et al.*, 2000; Naser *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été démontré sur un modèle d'étude *in vitro* mettant en co-culture MAP et des PBMC isolés de patients atteint de la MC, que la

présence de MAP induisait l'augmentation de la prolifération des LT ainsi que l'augmentation de la production de cytokines telles que l'IL-10 et le TNF-α (Sibartie *et al.*, 2009).

Enfin, il a été récemment prouvé que le 5 amino salisylic acid (5-ASA) ainsi que certain immunomodulateurs utilisés dans le traitements de la MC peuvent être considérés comme des antibiotiques actifs contre MAP (Greenstein and Collins, 2004; Greenstein *et al.*, 2007; Shin and Collins, 2008).

Il est donc bien défini que la bactérie est présente chez de nombreux patients et qu'elle intervient dans la régulation du SII. Deux hypothèses quant à son mode d'action restent à élucider ; i) l'infection par MAP intervient dans l'induction de la MC pour les patients qui sont exposés à cet organisme ou qui sont génétiquements susceptibles aux infections ou ii) cet organisme colonise les muqueuses ulcéreuses des patients mais n'intervient en rien dans l'induction ou la perpétuation de la maladie (Sartor, 2005).

Le rôle des bactéries pathogènes dans le développement des MICI est donc bien réel, même s'il n'est pas clairement défini à l'heure actuelle. Les études menées ont permis de découvrir l'existence de nouveaux facteurs qui peuvent jouer un rôle dans l'induction des MICI tels que la surexpression anormale de CEACAM6 ainsi que les mutations des récepteurs NOD-2/CARD-15 et des gènes codant pour les protéines impliquées dans l'autophagie : ATG16L1 et IRGM. Mais plus important, elles ont permis de trouver des marqueurs potentiels de diagnostic des MICI, par l'analyse de l'expression basale du récepteur CEACAM6, et la recherche de mutations dans les gènes codant pour les récepteurs NOD-2/CARD-15, il est aujourd'hui probable de déterminer une population à risque dans le développement de ces maladies.

Les MICI sont des maladies multifactoriels, nous venons de voir comment le stress oxydant, le microbiote ou encore l'intervention de bactéries pathogènes peuvent jouer un rôle dans le déclenchement de l'inflammation. Dans le prochain chapitre, nous allons aborder comment l'utilisation de probiotiques naturels ou reconbinants peut être utilisés dans le but de moduler l'inflammation et de maintenir un état de rémission chez les patients.

III. PROBIOTIQUES ET MICI

1) Modèles d'études

Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le développement des MICI et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques, il a été nécessaire de mettre au point différents modèles d'études *in vitro* et *in vivo* reproduisant au plus près les phénomènes physiologiques ayant lieu lors d'une colite humaine.

Parmi les modèles d'étude *in vitro*, la multiplication des modèles cellulaires utilisant les lignées cellulaires épithéliales HT-29 et Caco-2 ou encore de cellules mononucléaires de sang périphérique (PBMC) sont couramment utilisées afin de cribler des souches bactériennes selon un profil anti-inflammatoire ou encore d'étudier leurs mécanismes d'actions (Imaoka *et al.*, 2008).

Parmi les modèles *in vivo*, on retrouve i) les colites induites chez le modèle murin avec des agents chimiques tels que l'éthanol, l'acide acétique, les polysaccharides sulfatés (DSS) (Yamada *et al.*, 1992; Kitajima *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008); ii) les colites induites par l'activation du système immunitaire induisant ainsi la prolifération des LT (TNBS) (Foligne *et al.*, 2006) et iii) l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés, développant spontanément des colites tels que les souris knock-out IL-10 (KO IL-10), animaux dont le gène codant pour l'IL-10 est invalidé (Sheil *et al.*, 2006; Carroll *et al.*, 2007).

Dans le paragraphe qui suit, je vais plus particulièrement détailler les modèles *in vivo* DSS, TNBS ainsi que les modèles cellulaires, qui sont les modèles d'études que j'ai utilisé lors de ma thèse.

- **Les modèles d'études *in vitro* : modèles cellulaires d'origine humaine**

Cellules immunitaires d'origine sanguine

Les PBMC utilisées ont pour origine le sang humain, elles permettent l'analyse de la réponse immunitaire, car mises en co-culture avec des bactéries, elles vont réagir et produire des cytokines (IL-10, IL-12, IFN-γ…) qui permettent de déterminer le potentiel anti-inflammatoire des souches étudiées (Foligné *et al.*, 2007b).

Lignées cellulaires épithéliales d'origine intestinale : cellules HT-29 ou Caco-2

Originellement issues d'adénocarcinome colique humain, elles sont maintenues en culture par passages successifs. Stimulées avec un agent pro-inflammatoire (TNF-α ou IL-1β) elles vont produire de l'IL-8 dont la modulation par la bactérie est analysée par des tests ELISA (Sokol *et al.*, 2008).

Lignées de cellules HT-29 transfectées par un gène rapporteur dont l'expression est sous le contrôle d'élèments de réponse à NF-κB

Construite afin d'étudier le facteur de transcription NF-κB impliqué dans l'inflammation intestinale, cette lignée cellulaire contient un plasmide comprenant le gène de la luciférase sous le contrôle d'éléments de réponse à NF-κB. La mesure de l'activité luciférase après co-culture de la lignée de cellules HT-29 et de souches bactériennes permet de déterminer le profil inflammatoire des souches ainsi que leurs modes d'actions (Lakhdari *et al.*, 2009).

- **Les modèles d'études *in vivo* : modèles murins d'inflammation intestinale**

L'étude des modes d'actions et des effets anti-inflammatoires des souches bactériennes sur les modèles *in vitro* ne sont pas suffisant pour caractériser une souche comme ayant des effets potentiellement bénéfiques contre les inflammations chez l'homme. Il est nécessaire de tester ces souches sur des modèles plus complexes, rassemblant l'ensemble du système immunitaire et de l'écosystème intestinal tels que des modèles murins.

Bien que les modèles de colites murins soient essentiels à l'étude des mécanismes d'action ainsi qu'à la recherche de nouveaux traitements anti-inflammatoires, il est important de savoir que les colites induites, quelles qu'elles soient, ne reproduisent que partiellement les MICI. La complexité de ces maladies, l'intervention de différents facteurs déclenchants et l'absence de maladies semblables chez le modèle murin, sont des facteurs limitant dans le développement de ces modèles. A l'heure actuelle, les symptômes sont reproduits artificiellement, utilisant l'injection d'agents chimiques ou modifiant le système immunitaire.

Les modes d'actions des colites animales sont donc différents en fonction du modèle choisi, c'est pourquoi il reste indispensable d'utiliser plusieurs modèles pour une même étude et ainsi permettre de se rapprocher au mieux des colites induites chez les patients atteints de MICI.

Le modèle DSS : Dextran Sodium Sulfate

L'ajout de DSS dans l'eau de boisson des souris pendant 7 à 10 jours va reproduire les symptômes d'une colite aiguë, représentant le premier stade d'inflammation de la RCH chez l'homme. Mis au point par Okayasu en 1990, son mode d'action reste encore à élucider, pour autant, son utilisation dans l'étude des effets anti-inflammatoires de souches bactériennes est très courante (Okayasu *et al.*, 1990).

Le mode opératoire consiste à administrer oralement les souches bactériennes aux souris pendant 9 jours par sondage intragastrique à hauteur de 10^9 UFC par souris. Au $2^{ème}$ jour, l'ajout du DSS dans l'eau de boisson est effectué, la dose peut varier de 1% à 5% selon le type de colites que l'on souhaite obtenir (modérée à sévère), le sacrifice a lieu au $9^{ème}$ jour (Fig. 22).

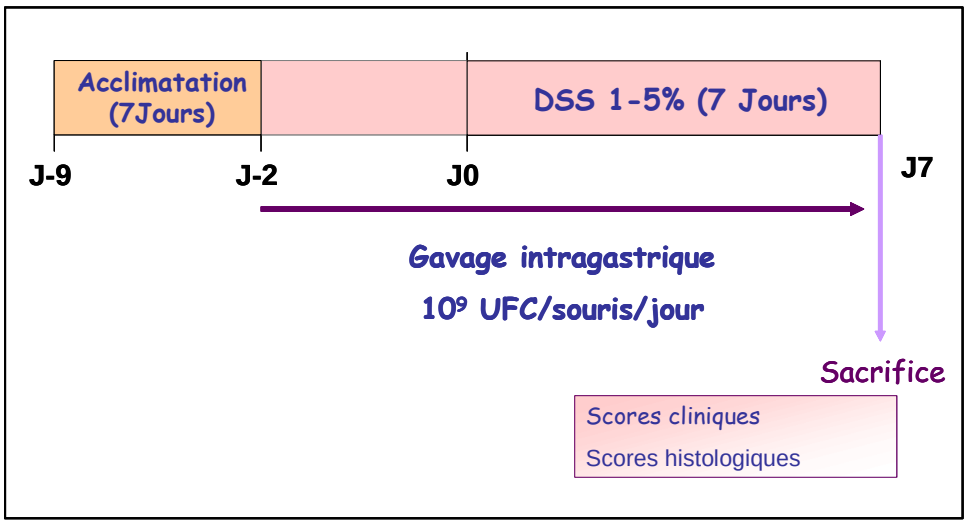


Fig. 22: Mode opératoire de la colite murine induite au DSS.

Les effets anti-inflammatoires des souches sont évalués selon plusieurs critères (Schultz *et al.*, 2004):

L'évaluation clinique quotidienne selon une échelle de 0 à 4, qui comprend la consistance et la présence de sang au sein des fèces ainsi que la perte de poids, la moyenne des trois critères permettant d'obtenir un score d'activité.

Un score histologique selon une échelle de 0 à 4, qui comprend la sévérité et l'extension de l'inflammation et les dommages causés aux cryptes, l'ensemble en fonction du pourcentage

d'atteinte de la muqueuse. La somme des trois critères permettant d'obtenir le score histologique (Fig. 23).

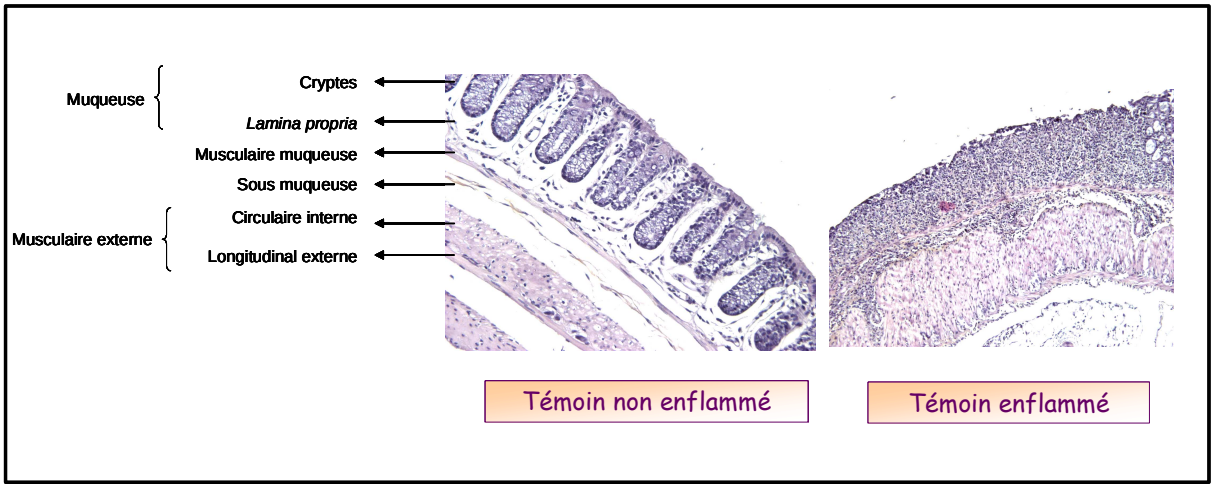


Fig. 23: Coupe histologique de muqueuse murine enflammée ou non avec du DSS (Watterlot *et al.*, soumis).

Le modèle TNBS : TrinitroBenzenSulfonic Acid

La colite induite par l'injection de TNBS reproduit plus spécifiquement les symptômes de la MC, le TNBS est un haptène qui va se lier aux protéines des tissus et stimuler ainsi l'immunité à médiation cellulaire Th1 *via* l'activation des LT.

Le mode opératoire consiste à administrer oralement les souches bactériennes aux souris pendant 7 jours par sondage intragastrique à hauteur de 10^9 UFC/souris. Au $5^{ème}$ jour l'injection par voie intra-rectale de TNBS est effectuée, la dose varie de 50 mg/Kg à 150 mg/Kg. Le sacrifice a lieu au $7^{ème}$ jour (Fig. 24).

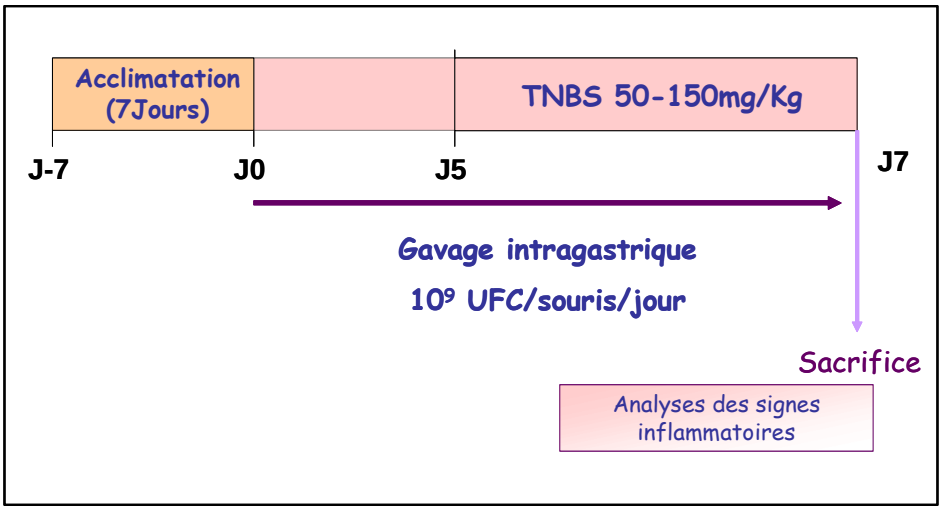


Fig. 24: Mode opératoire de la colite murine induite au TNBS.

Les effets anti-inflammatoires des souches sont évalués selon plusieurs critères :

Les scores cliniques, établis selon deux principaux critères i) la détermination du poids des souris le jour de l'administration du TNBS puis 48 h après et ii) l'état général des souris selon une échelle de 0 à 2 (vitalité, recroquevillement, dos rond…) ainsi que l'aspect visuel (poils hérissés, abîmés…).

L'analyse du côlon par la détermination de la longueur et du calibre distal et moyen.

Les scores des selles, selon une échelle de 0 à 5, en fonction de la consistance et de la présence de sang dans les fèces.

Les scores macroscopiques de Wallace, établis selon une échelle de notation de 0 à 10, en fonction de l'état macroscopique de la muqueuse du côlon : la présence d'ulcères, l'épaississement de la paroi, le nombre de sites d'ulcérations et d'inflammations majeures (Fig. 25). (Wallace *et al.*, 1989).



Fig. 25: Muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS.

Les scores histologiques, établi selon une échelle de notation de 0 à 6, en fonction de l'état microscopique de la muqueuse du côlon : la présence d'infiltrats inflammatoires, d'ulcérations et de nécroses de la muqueuse et de la sous muqueuse, cela en fonction du pourcentage de la muqueuse atteinte (Fig. 26) (Ameho *et al*., 1997)**.**

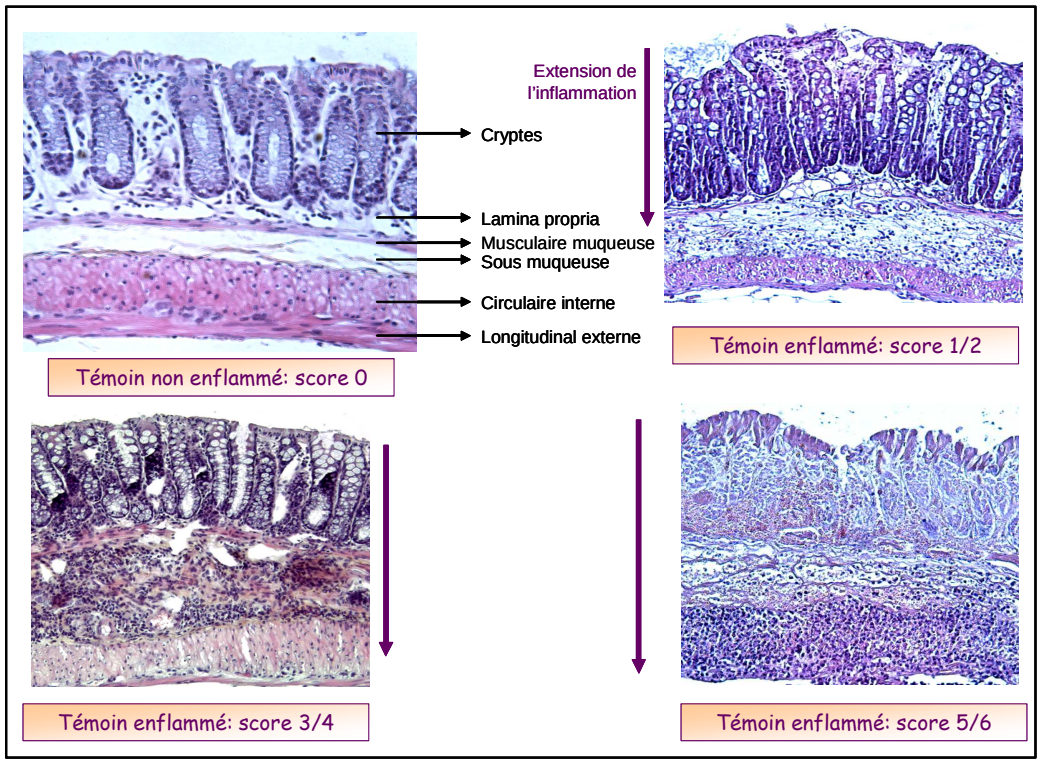


Fig. 26: Coupe histologique de muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS, évaluées selon le score d'Ameho.

Afin d'évaluer l'effet de protection de souches probiotiques anti-inflammatoires sur ce modèle, une méthode de calcul du pourcentage de protection (PP) de la souche en minimisant les variations d'expérimentations a été mise au point (Foligne *et al.*, 2006) :
PP=100X [(Score de Wallace du groupe témoin positif TNBS)-(Score de Wallace du groupe à tester)] / Score de Wallace du groupe témoin positif TNBS.
Selon ce critère, une souche est considérée comme anti-inflammatoire, dès lors que l'on atteint 30% d'atténuation de la colite.

Pour conclure, nous venons de voir que de nombreux modèles expérimentaux sont disponibles afin d'étudier les colites, de cribler de nouvelles souches probiotiques ou encore d'élucider les mécanismes d'action de nouvelles protéines thérapeutiques.
De nombreux modèles murins génétiquement modifiés ont également été développés pour étudier l'influence des facteurs tels que l'IL-10 (Sheil *et al.*, 2006; Carroll *et al.*, 2007), le MyD88 (Fukata *et al.*, 2008), ou encore le TLR-2 (Zeuthen *et al.*, 2008), dans ces modèles les gènes ciblent sont inactivés permettant ainsi de vérifier si l'effet des souches testées dépend des produits des gènes inactivés. L'influence de la flore sur l'inflammation peut aussi être étudiée *via* des comparaisons entre des souris axéniques et conventionnelles.

L'ensemble de ces modèles permet de mieux comprendre les mécanismes d'actions de l'inflammation et les moyens d'y remédier. Malgré cela, il est nécessaire de rester vigilant quant aux limites que proposent ces modèles et bien que certaines études démontrent d'excellentes corrélations entre les modèles *in vitro* et *in vivo* (Foligne *et al.*, 2006), il est indispensable de multiplier les modèles lors de la caractérisation des effets anti-inflammatoires d'une nouvelle souche ou de l'étude des mécanismes d'actions d'une nouvelle molécule. Enfin, les essais cliniques humains restent le meilleur moyen de finaliser les tests afin de confirmer les effets des souches potentillements anti-inflammatoires démontrées sur les modéles d'études.

2) Probiotiques et MICI

- **Généralités**

Comme nous l'avons vu précédemment, la balance entre les bactéries bénéfiques et opportunistes détermine l'homéostasie ou l'inflammation intestinale. Cette balance peut

notamment être modulée par la prise d'antibiotiques, de probiotiques ou prebiotiques, cela, dans le but de traiter et de prévenir les rechutes de MICI.

Metchnikoff a été le premier à évoquer le concept de « probiotique » (Ducluzeau, 2002). Un panel d'experts des commissions « Food and Agriculture Organization of the United Nations » et de l'organisation mondiale de la santé ont défini en 2001 les probiotiques comme étant des « **microorganismes vivants, qui, administrés en quantité suffisante, confèrent des effets bénéfiques pour son hôte au-delà de leurs valeurs nutritionnelles** » (Bergonzelli *et al.*, 2005; OMS., 2001).

Les effets des probiotiques sont multiples. Ils pourraient prévenir certaines maladies telles que les infections systémiques, les maladies diarrhéiques, le cancer et les allergies. Ils jouent un rôle important dans le traitement des maladies inflammatoires et de l'hypercholestérolémie. Ils permettent également d'alléger l'intolérance au lactose et de stimuler le système immunitaire. Enfin, ils procurent à leur hôte des propriétés nutritives par la production de métabolites tels que des acides aminés, des acides gras à chaîne courte et des acides lactiques (Neu and Caicedo, 2005).

Les probiotiques sont aujourd'hui les acteurs d'un grand mouvement marketing, on retrouve ainsi de nombreux aliments dans lesquels de telles souches sont rajoutées. Les principales souches utilisées en industries alimentaires sont *Lb. casei* (dans l'Actimel de Danone) et *Bifidobacterium* (dans l'Activia de Danone). Le marché des pro- et prébiotiques (facteur de croissance des probiotiques) est en constante augmentation, pour exemple, le secteur nutrition médicale de Danone comprenant les produits phares Actimel et Activia atteint un chiffre d'affaire de 0,9 milliard d'euros en 2008 (Danone, 2008).

Afin de pouvoir exercer tous ces rôles bénéfiques pour la santé, les probiotiques ingérés oralement au sein d'un aliment vont devoir résister à de nombreuses agressions. Ils vont pénétrer dans le côlon où ils doivent résister au pH acide et être actifs métaboliquement (Abbott, 2004). Pour cela, ils vont rentrer en compétition avec une centaine d'autres espèces microbiennes. Cette compétition va s'effectuer majoritairement sur deux critères : la disponibilité en substrats et l'adhésion à l'épithélium intestinal.

Lors de ma thèse, je me suis intéressée principalement à des souches bactériennes de deux genres bactériens possédant des effets probiotiques anti-inflammatoires reconnus :

Lactobacillus et *Bifidobacterium*. En effet, de nombreuses études mettent en avant la possibilité de maintenir l'état de rémission des patients, voire même de diminuer les symptômes de crise par l'administration orale de ces bactéries. Dans les paragraphes qui suivront, je vais donc plus particulièrement détailler les recherches effectuées sur les effets anti-inflammatoires des souches de lactobacilles et de bifidobactéries, leurs effets potentiels sur les MICI ainsi que leur mécanismes d'actions.

- ***Bifidobacterium. spp* et *Lactobacillus. spp***

Bifidobacterium. spp est présent naturellement dans l'intestin qu'il colonise durant la première semaine après la naissance. Il fait partie des Actinobactéries, c'est un genre anaérobie strict à Gram positif qui possède un haut pourcentage en base GC (entre 55 et 64%) (Van Der Werf, 2001). Son activité métabolique rejoint celle des BL, par la production d'acétate et de lactate. Il représente 95% du microbiote de l'enfant et 3% de l'adulte. On dénombre environ 30 espèces différentes dont certaines sont considérées comme probiotiques (Trebichavsky *et al.*, 2009) (Fig.27).

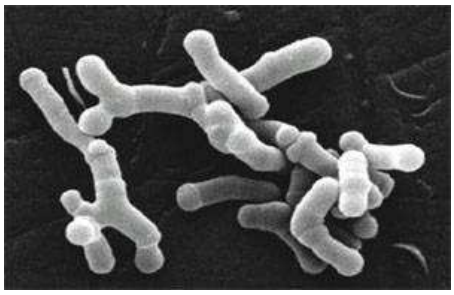


Fig. 27: *Bifidobacterium longum* (Schell, université de Georgie).

Les lactobacilles se présentent sous forme de bacilles ou coccobacilles, isolés ou en chaînettes, ils sont immobiles à Gram positif, leur type respiratoire est AAF (Fig. 28). Ils appartiennent au genre actinobactéries. Ils ont été isolés à partir de niches écologiques très variées : les flores buccales, intestinales et vaginales de l'être humain et des animaux, les produits laitiers, les végétaux, les viandes et les poissons… Considérés comme BL, ils sont couramment utilisés dans la fabrication des produits laitiers. Concernant l'écosystème intestinal, les lactobacilles font partie de la flore sous-dominante (Guarner and Malagelada, 2003). De nombreuses espèces sont également considérées comme probiotiques, elles permettent notamment de diminuer les risques de caries induites par *Streptococcus mutans* (Ahola *et al.*, 2002).

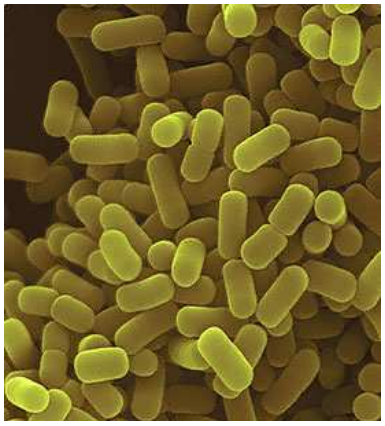


Fig. 28: *Lactobacillus plantarum* (Kunkel., 2004).

Ces deux genres bactériens possèdent des propriétés intrinsèques spécifiques qui leur confèrent de nombreux avantages au sein de l'environnement parfois hostile du TD et leur permettent ainsi d'agir en tant que probiotique. En effet, ils sont capables de coloniser l'intestin et de résister aux différents stress rencontrés *in vivo*.

Les bifidobactéries possèdent des capacités hydrophobes permettant d'augmenter l'adhésion aux surfaces (Kerckhoffs *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009), ils reconnaissent différents récepteurs de l'épithélium intestinal (Guglielmetti *et al.*, 2009) et leur capacité à dégrader les sucres complexes leur confère un avantage dans la compétition vis-à-vis des nutriments qui se révèle être un facteur déterminant pour l'implantation (Klijn *et al.*, 2005). De plus, ils sont capables de moduler la réponse immunitaire et de créer une tolérance vis à vis de l'hôte (Trebichavsky *et al.*, 2009). Ces propriétés leur permettent donc d'obtenir une capacité d'adhésion sur les cellules intestinales telles que décrit sur les cellules *in vitro* Caco-2 (Delgado *et al.*, 2008).

Outre la capacité à coloniser l'intestin, les bifidobactéries et les lactobacilles sont particulièrement adaptés aux stress rencontrés *in vivo* tel que le stress biliaire (Collado and Sanz, 2007; Masco *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2008; Koll *et al.*, 2008) et le pH acide rencontré dans l'estomac (Delgado *et al.*, 2008; Koll *et al.*, 2008). Plusieurs investigations ont démontré que la résistance aux stress des bifidobactéries pouvait provenir de transporteurs. En effet, l'expression du gène codant pour le transporteur BL0920 présent au sein de la souche *B. longum* NCC2705 augmente d'un facteur 20 en présence de sels biliaires, son homologue a également était identifié au sein de la souche *B. breve* (Bbr0838). Ces travaux indiquent que

ces transporteurs jouent probablement un rôle dans résitance au stress biliaire des bifidobactéries (Gueimonde *et al.*, 2009). L'implication de certaines protéines telles que la protéine DnaK, sont également impliquées dans la réponse aux stress biliaire, osmotique et thermique (Sanchez *et al.*, 2005). Enfin, il a été démontré l'existance d'une corrélation entre la production d'exopolysaccharides et la résistance aux sels biliaires et au pH acide des bifidobactéries (Alp, 2009). Concernant les lactobacilles, il a été démontré que certains gènes de *Lb. plantarum*, impliqués dans l'enveloppe cellulaire (biosynthèse des acides gras et des composants de la paroi) étaient activés en réponse à un stress biliaire (Bron *et al.*, 2004). La persistance au sein du TD de souris par des bifidobactéries en transit peut s'élever à une dizaine de jours (Sheehan *et al.*, 2007) ce qui lui confère un excellent avantage pour agir en tant que probiotique. Concernant les lactobacilles, il a été démontré qu'ils pouvaient persister plus d'une semaine dans les fèces de souris après l'arrêt de la consommation (Pavan *et al.*, 2003) et que cette survie était 7 fois supérieure à celle d'un lactocoque dans le TD de l'homme (Vesa *et al.*, 2000).

- **Effets anti-inflammatoires et modes d'action**

Exemples d'études cliniques

Diverses études cliniques ont démontré l'intérêt d'étudier les effets anti-inflammatoires des bifidobactéries ainsi que des lactobacilles. Une première constatation permet de penser que les bifidobactéries peuvent jouer un rôle potentiel au sein des MICI. En effet, la concentration des bifidobactéries au niveau du duodénum des patients atteints de MICI est diminuée en comparaison avec des personnes saines (Kerckhoffs *et al.*, 2009). De même, une diminution de la concentration des deux genres bactériens dans la flore fécale des patients atteints de la MC en comparaison avec des sujets sains à été observé (Favier *et al.*, 1997). Il a également été démontré que la prise orale de bifidobactéries permettait d'améliorer la douleur abdominale et le confort digestif de patients (O'Mahony *et al*., 2005; Guyonnet *et al*., 2007). Enfin, une étude portant sur les effets d'un lait fermenté en bifidobactéries sur le maintien de la rémission de patients souffrants de colites ulcéreuses a démontré des effets supérieurs au placébo (Ishikawa *et al*., 2003; Cui *et al*., 2004). De même en ce qui concerne les lactobacilles, des effets supérieurs au placebo d'une souche de *Lb. rhamnosus* GG (LGG) sur la prévention de la pouchite ont été observés (Prantera *et al*., 2002; Gosselink *et al*., 2004). Enfin, une étude portant sur l'administration orale de lactobacilles et de bifidobactéries à permi de prévenir la rechute des patients atteints de colites ulcéreuses (Venturi *et al.*, 1999).

Nous avons vu précédemment que les bifidobactéries ainsi que les lactobacilles possédaient les qualités requises pour s'adapter l'environnement du TD et exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. Leurs modes d'action divergent de part leurs capacités intrinsèques mais l'ensemble des études réalisées permet de définir différentes façons d'interagir ; i) par l'intéraction bactéries-bactéries au sein de l'écosystème ; ii) par la préservation de la barrière intestinale et iii) par la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte.

Interaction bactéries-bactéries

Outre la compétition vis-à-vis des nutriments et des sites de fixation au niveau de la muqueuse intestinale, nos deux genres bactériens sont capables de protéger les enterocytes contre la réponse inflammatoire induit par des pathogènes. En effet, deux souches de *B. longum* et *B. lactis* sont capables d'inhiber 40% de l'adhésion d'*E. coli* enterotoxinogènes tels que *E. coli* H10407 sur des cellules intestinales Caco-2. De même, *Lb. plantarum* est capable d'inhiber 43 à 66% de l'adhésion (Candela *et al.*, 2008). Les deux genres bactériens sont également capables de diminuer la production d'IL-8 par les cellules intestinales HT-29 (Candela *et al.*, 2008). Différentes hypothèses sont alors émises concernant leurs capacités à produire des composants anti-bactériens, anti-adhésions, ainsi que leurs capacités à diminuer le pH de la lumière intestinale ou à créer une compétition vis à vis des nutriments (Imaoka *et al.*, 2008). Ces hypothèses sont confirmées par une étude démontrant que *B. animalis* et *Lb. casei* produisent des antagonistes de bactéries pathogènes telles qu'*E. coli* (Martins *et al.*, 2009) et que les lactobacilles sont capables de produire des bactériocines ayant des effets anti-bactériens (Oozeer *et al.*, 2002).

En 2005, les travaux menés par Lan *et al.*, ont permi d'étudier l'influence de LGG sur la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6) par *Bacteroides ovatus* (Lan *et al.*, 2005). Ils ont démontré qu'en présence de LGG, la stimulation de la production d'IL-6 par *B. ovatus* était inhibée. Cette étude montre bien que LGG peut interférer avec d'autres bactéries commensales des cellules épithéliales de l'intestin telles que *B. ovatus* afin de réguler la production de cytokines pro-inflammatoires et diminuer ainsi l'inflammation. Enfin il a été démontré que l'administration de *B. lactis* permettait de préserver la barrière épithéliale et de prévenir ainsi la translocation bactérienne (Garcia-Urkia *et al.*, 2002). Nous venons de voir que les interactions inter-espèces peuvent avoir de nombreuses conséquences pour l'hôte, ceci

démontre à quel point l'écosystème intestinal et le maintien de l'homéostasie est nécessaire pour la santé de l'homme.

L'interaction envers les autres espèces bactériennes n'est pas le seul moyen d'exercer des effets anti-inflammatoires, en effet, de nombreuses études mettent en avant la capacité des probiotiques à moduler directement la réponse de l'hôte.

Modulation de la réponse immunitaire

Diverses études ont démontré les effets anti-inflammatoires des bactéries *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* sur des colites expérimentales (Chen *et al.*, 2005; Llopis *et al.*, 2005; Peran *et al.*, 2007). Leurs modes d'action sur l'hôte divergent et de nombreuses études mettent en avant leur capacité à restaurer l'équilibre entre la balance des cytokines pro/anti-inflammatoires i) par la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IFN-γ) par les cellules mononucléaires de la *lamina propria* (Matsumoto *et al.*, 2005) et ii) par l'augmentation de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF-β (Chen *et al.*, 2005; Helwig *et al.*, 2006; Imaoka *et al.*, 2008). La modulation de la sécrétion de cytokines est sans doute une conséquence des effets des bifidobactéries et des lactobacilles sur d'autres facteurs intervenant en amont dans le système immunitaire. En effet, il est problable que le PEG de la paroi des bifidobactéries interagit avec un complexe TLR-2/TLR-1 ou TLR-2/TLR-6 situé sur les CD entraînant une inhibition de la reconnaissance du PEG-NOD-2, inhibant ainsi la voie NF-κB et donc la voie Th1 (Fig. 29) (Zeuthen *et al.*, 2008). Il est également possible que les bifidobactéries soient capables d'inhiber la fonction du proteasome, bloquant ainsi la dégradation de IκB et par conséquent, l'action pro-inflammatoire de NF-κB (Jijon *et al.*, 2004).

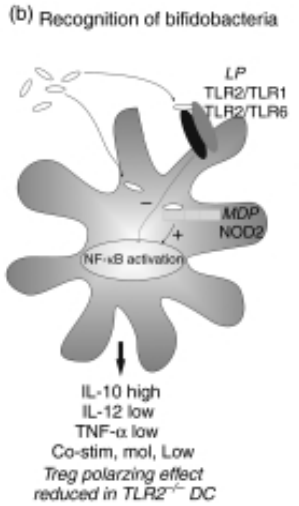


Fig. 29: Schéma représentant les mécanismes des CD dans la reconnaissance des bifidobactéries (Zeuthen et al., 2008).

Concernant les lactobacilles, le rôle de *Lb. acidophilus* dans la diminution de l'activation des neutrophiles et du stress oxydant a été démontré (Peran *et al.*, 2007). Les probiotiques tels que *B. longum* et *Lb. acidophilus* sont également capables d'induire une protection vis à vis des pathologies inflammatoires intestinales *via* la régulation des lymphocytes de la *lamina propria* en augmentant la concentration de LTIE (qui ont pour rôle de diminuer l'inflammation et de contribuer à l'homéostasie) (Roselli *et al.*, 2009). De même, l'augmentation d'IL-10 sécrétée par les CD *via* l'activation des bifidobacteries entraîne une augmentation des Treg et régulent l'inflammation (Christensen *et al.*, 2002). Les Treg quant à eux, régulent la production de LT $CD8^+$ et limitent ainsi la réponse pro-inflammatoire.

L'ADN probiotique peut également interagir avec le système immunitaire de l'hôte *via* le récepteur TLR-9 et supprimer ainsi la réponse inflammatoire induit par de l'ADN pathogène (Jijon *et al.*, 2004).

Les effets des probiotiques peuvent être dus à la bactérie vivante ou encore à son ADN qui est reconnu par les récepteurs des cellules de l'épithélium. Il existe une dernière forme d'interaction avec le système immunitaire mettant en cause des molécules sécrétées par la bactérie elle-même et possédant des effets anti-inflammatoires.

Production de molécules anti-inflammatoires

Les bactéries commensales sont capables de moduler le système immunitaire notamment par la sécrétion de molécules telles que le butyrate.

Lors du séquençage de *B. longum*, une séquence analogue à la séquence codant pour la serpine (protéase inhibitrice de la sérine eucaryote), ayant des effets anti-inflammatoires et étant impliquée dans la réponse immunitaire a été mis en évidence (Schell *et al.*, 2002). Une hypothèse concernant l'existence d'un facteur soluble produit par les bifides a également été émise (Ivanov *et al.*, 2006; Heuvelin *et al.*, 2009). Ce facteur serait capable de cibler les cellules épithéliales et dendritiques afin de moduler la réaction inflammatoire en inhibant la sécrétion d'IFN-γ initialement induite par l'activation de NF-κB, permettant ainsi de diminuer les effets des colites induites au TNBS.

Les probiotiques agissent sur l'écologie, la modulation de la réponse immunitaire et l'augmentation de la barrière épithéliale. Ces effets sont souches spécifiques et dépendent du potentiel de ces souches à résister à l'environnement du TD et à coloniser l'intestin (Peran *et al.*, 2007). Ils sont capables de moduler la sécrétion de cytokines par les CD et d'influencer le système immunitaire inné et adaptatif, d'interagir avec les cellules épithéliales et de moduler ainsi les voies Th1 et Th2 (Madsen, 2006). Leurs modes d'action senblent très complexes et peu ont été élucidés jusqu'à présent. Il paraît donc nécessaire de poursuivre les recherches dans ce domaine afin d'approfondir le dialogue bactéries-hôte.

3) Bactéries recombinantes et MICI

- **Présentation des Bactéries Lactiques Génétiquement Modifiées (BLGM)**

Généralités

Nous venons de constater que les probiotiques naturels peuvent être efficaces contre les inflammations grâce à leurs propriétés intrinsèques. A présent, nous allons voir, que les BL peuvent également être utilisées comme outils afin de véhiculer des protéines anti-inflammatoires au sein du TD et constituer ainsi des probiotiques recombinants.

L'originalité du concept BLGM réside dans le fait d'utiliser des BL qui possèdent différents avantages telles que i) leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe), qui indique qu'elles sont non invasives et non pathogènes (Salminen *et al.*, 1998; Bermudez-Humaran, 2004); ii) leur utilisation intensive dans l'industrie alimentaire (intervenant à 70% du chiffre d'affaire de l'industries laitière française) et iii) leurs capacités à résister à l'environnement *in vivo* et à persister au sein du TD. Tous ces paramètres sont essentiels, et leurs confèrent d'excellents avantages en tant que vecteurs de protéines d'intérêt santé.

L'utilisation des BLGM dans la recherche est décrite depuis une dizaine d'année : elle permet d'une part, d'étudier les mécanismes d'action de certaines protéines et d'autre part, de délivrer une protéine d'intérêt santé au sein de l'environnement intestinal. Parmi les protéines d'intérêts santés véhiculées, on retrouve des Ag bactériens ou viraux (Cortes-Perez *et al.*, 2009), des enzymes (Matsumoto *et al.*, 2005), des interleukines (Schotte *et al.*, 2000) ou encore des agents antioxydants (Han *et al.*, 2006).

La bactérie lactique modèle : Lactococcus lactis

La BL modèle utilisée dans ce domaine est *L. lactis*, coque à Gram positif, aérobie strict, largement utilisé dans l'industrie fromagère (notamment dans la fabrication du Cheddar, fromage le plus consommé dans le monde) (Fig. 30). De nombreux outils moléculaires sont disponibles pour cette bactérie et le génome de la souche avec laquelle nous travaillons, à savoir *L. lactis* MG1363, est séquencé (Wegmann *et al.*, 2007). De plus, elle sécrète peu de protéines et seule l'Usp45 est visible sur la coloration bleu de Coomassie (Van Asseldonk *et*

al., 1990), elle ne contient pas de plasmide et ne sécrète pas de protéases (Chopin *et al.*, 1984) ce qui en fait une bonne candidate hôte de production de protéines.



Fig. 30: ***Lactococcus lactis.***

Récemment, de nouveaux genres bactériens plus adaptés aux conditions environnementales du TD, ont été utilisés afin de délivrer des molécules d'intérêt santé. En effet, *L. lactis* est un formidable outil moléculaire mais sa survie au sein du TD est faible, 0.1 à 2% (Klijn *et al*., 1995), cela est notamment dû à sa faible capacité à résister à la lyse lors du passage dans le duodénum (Vesa *et al.*, 2000). De plus, il ne s'agit pas d'une bactérie probiotique or, il est assez intéressant lors de l'utilisation de BLGM dans le traitement des MICI de combiner les effets anti-inflammatoires de la souche sauvage avec l'action anti-inflammatoire de la molécule hétérologue produite par cette même souche. C'est notamment le cas de bactéries telles que *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, qui semblent être de meilleurs vecteurs bactériens du fait de leur capacité à résister au transit et de leurs propriétés probiotiques intrinsèques. Il a été démontré que l'utilisation du vecteur *Lb. plantarum* ancrant l'antigène E7 du papillomavirus humain de type 16 (HPV-16) à sa paroi, permettait d'induire une meilleure réponse immunitaire que le vecteur *L. lactis* utilisé dans les mêmes conditions (Cortes-Perez *et al*., 2007). L'utilisation de lactobacilles et de bifidobactéries en tant que vecteurs de protéines hétérologues a représenté une grande partie de mes travaux de thèse et nous avons notamment comparé les capacités de *Lb. plantarum* et *B. infantis* à délivrer un Ag *in vivo.*

L'utilisation de *L. lactis* en tant que BLGM est privilégiée dans les cas de recherche fondamentale où l'on souhaite étudier le mécanisme d'action de la molécule produite par la

bactérie. En effet, le vecteur ne doit avoir aucune influence sur le système immunitaire, *L. lactis* est donc la quandidate idéale car elle est faiblement immunogène. C'est ainsi que l'équipe de Steidler, a mis en évidence que l'IL-10 délivrée *in situ* permettait de diminuer significativement des colites expérimentales (Steidler *et al.*, 2000).

Les BLGM en recherche fondamentale

Les BLGM sont également utilisées en recherche fondamentale. La construction de souches mutantes permet d'étudier les mécanismes d'actions de certaines bactéries et d'ainsi approfondir les connaissances du dialogue bactéries-hôte. Prenons pour exemple l'étude de Grangette *et al.*, menée en 2005 afin de comprendre le rôle des acides teichoïques des BL. Cette étude a permis de mettre en évidence des propriétés anti-inflammatoires d'une souche de *Lb. plantarum* mutant. Cette souche posséde la particularité de contenir moins de D-alanine (acide-aminé) au sein des acides téichoïques par rapport à la souche sauvage. Les auteurs ont alors observé une diminution significative de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF-α) parallèlement à une augmentation de la production d'IL-10 (Grangette *et al.*, 2005). De Vos souligne dans un éditorial, que la composition des acides lipotéichoïques des BL peut moduler la réponse inflammatoire et faire varier ainsi l'équilibre de la balance des cytokines pro/anti-inflammatoires (De Vos, 2005). Une autre étude a permis de mettre au point plusieurs souches de *L. lactis* dont la sensibilité au lysozyme *in vitro* diffère par la modification de l'expression de la peptidoglycane deacétylase qui augmente le degré de deacétylation du PEG et diminue ainsi la sensibilité vis-à-vis du lysozyme (Meyrand *et al.*, 2007). Ces travaux se rapprochent d'une seconde étude où le niveau de D-alanination du PEG à été modifié par la construction d'un mutant inactivé du gène alanine racemase (*ala*), enzyme participant à la synthèse de la paroi bactérienne (Grangette *et al.*, 2004). Sa délétion entraîne une augmentation de la lyse de la bactérie. La souche mutante produit également un fragment de la toxine tétanique permettant ainsi l'étude de la réponse immunitaire induite *in vivo*. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que la souche mutante *alr*- induit une réponse immunitaire plus intense que la souche sauvage révélée par l'augmentation de la production d'IgA par l'hôte. Ainsi les auteurs ont émis l'hypothèse que la lyse bactérienne permettrait d'augmenter les capacités de vectorisation des BLGM.

Ainsi, la construction de souches mutantes permet d'élucider certains mécanismes d'action des bactéries envers l'hôte et démontre l'intérêt de l'utilisation efficace des BLGM en recherche fondamentale.

Les BLGM : vecteur de protéine d'intérêt santé

L'utilisation de BLGM en tant que vecteurs de protéines d'intérêt santé comporte plusieurs avantages. En effet l'utilisation d'un vecteur bactérien permet de délivrer localement la protéine d'intérêt au sein même du TD, obtenant ainsi une action précise et localisée de la protéine. De plus, de nombreuses protéines d'intérêt sont labiles et faiblement immunogènes, c'est notamment le cas de l'antigène E7 du HPV-16. L'utilisation d'un vecteur bactérien protège la protéine contre les attaques biliaires et acides de l'estomac, des molécules telles que le lysozyme, des bactériocines ou encore des défensines produites par notre organisme. Ce procédé augmente également l'immunogénicité de l'Ag délivré (Medina and Guzman, 2001; Rocha *et al*., 2004). L'emploi des BLGM permet de réduire significativement la teneur en protéines délivrées en comparaison avec une injection par voie systémique, diminuant ainsi le coût et les effets secondaires observés après l'injection de certaines protéines telles que des hormones, des interleukines ou des Ag (Bermudez-Humaran, 2004). Enfin, le génie génétique nous permet de tester différents systèmes de vectorisation en fonction de la localisation de la protéine d'intérêt qui peut être soit ancrée à la paroi, sécrétée ou cytoplasmique et sous le contrôle de promoteurs constitutifs ou inductibles.

Techniques génétiques utilisées

Deux paramètres sont essentiels lorsque l'on veut faire produire une protéine d'intérêt santé à une BL i) la localisation cellulaire de la protéine, selon qu'elle soit ancrée à la paroi, sécrétée ou simplement produite, son mode d'action va varier et ii) le système d'expression de la protéine qui peut être soit, sous le contrôle d'un promoteur constitutif soit, sous le contrôle d'un promoteur inductible permettant ainsi de maîtriser sa production. Le choix de la localisation cellulaire de la protéine dépend de ce que l'on souhaite étudier et du mode d'action de la bactérie que l'on souhaite utiliser.

Production cytoplasmique : cette localisation permet de protéger la protéine des attaques de l'environnement du TD mais nécessite la lyse de cette dernière afin de pouvoir agir sur l'hôte,

son utilisation peut être intéressante dans le cas d'études concernant les effets de la lyse sur la vectorisation de protéine.

Système de sécrétion : cette localisation permet d'obtenir une interaction directe de la protéine avec l'environnement du TD. Cette construction nécessite la présence d'un peptide signal (PS), la protéine immature présente dans le cytoplasme va traverser la membrane de la BL grace au PS, puis après clivage par une enzyme, la signal peptidase (SPase), la protéine mature se retrouve dans le milieu extérieur et peut ainsi interagir avec l'hôte (Fig. 31).

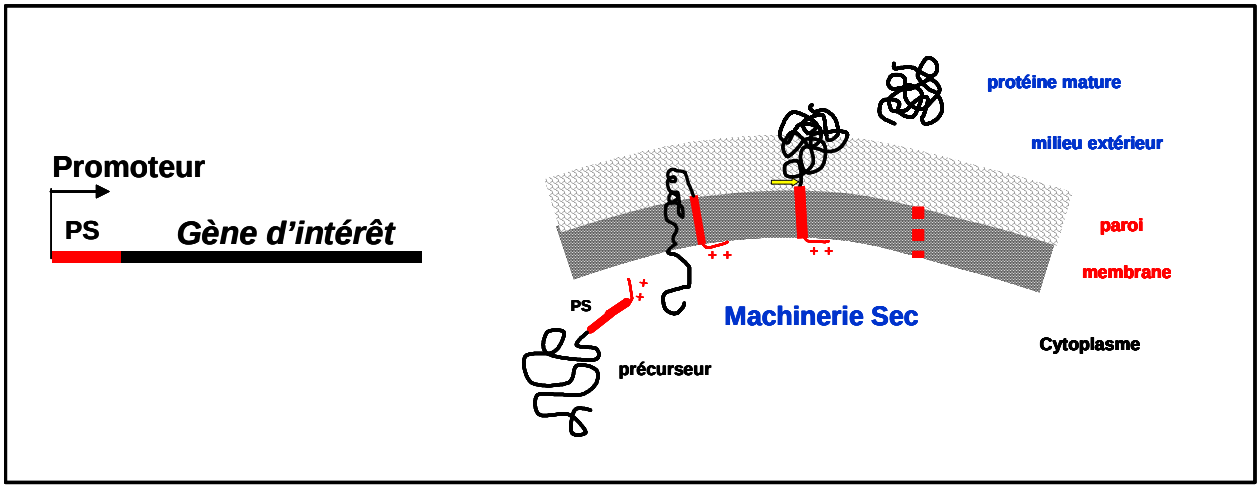


Fig. 31: Sécrétion d'une protéine d'intérêt.

Système d'ancrage à la paroi : cette localisation permet de combiner les avantages des deux localisations précédentes à savoir une interaction directe de la protéine avec l'environnement extérieur ainsi qu'une protection vis-à-vis de la protéolyse. Cette construction nécessite la présence d'un PS ainsi qu'un motif d'ancrage à la paroi (CWA). Le PS permet la translocation de la protéine à travers la membrane, CWA reste ancrée dans la paroi, la SPase agit en libérant le PS et la protéine mature qui reste ancrée à la paroi, une deuxième enzyme, la sortase, intervient en libérant la partie hydrophobe du système qui reste dans la cellule (Fig. 32).

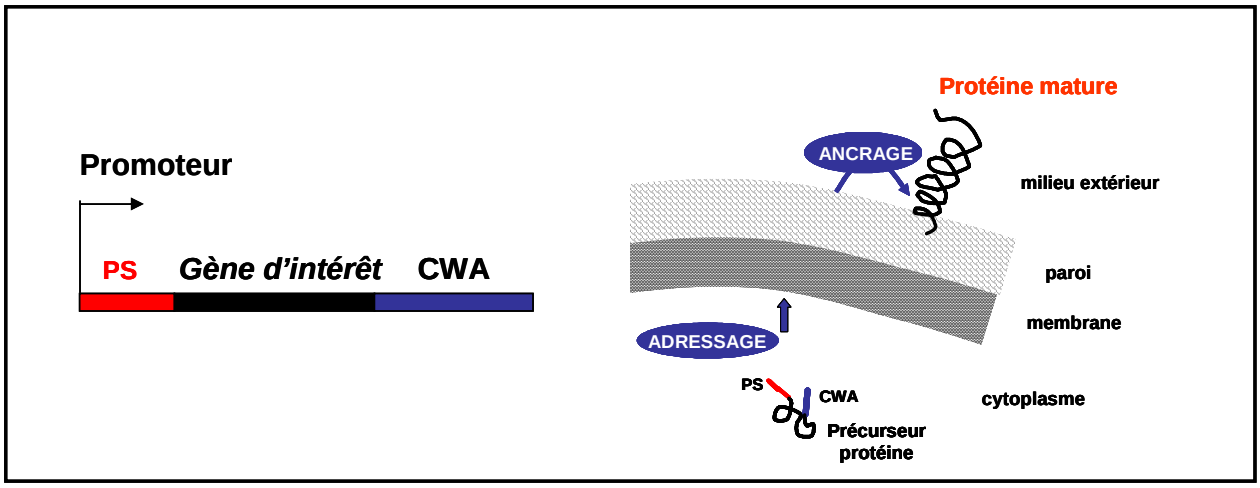


Fig. 32 : Ancrage d'une protéine d'intérêt à la paroi bactérienne.

Certaines protéines telles que les cytokines peuvent s'accumuler au sein du cytoplasme de la bactérie et dégrader ainsi la cellule, d'où la nécessité de mettre en place des systèmes de régulation tels que des promoteurs inductibles. Ces systèmes permettent de prévenir d'éventuels effets négatifs de la surproduction de la protéine hétérologue en contrôlant l'expression du gène par un environnement extérieur tel que le pH, la température, la concentration en sels biliaires ou encore la présence de peptide antimicrobien (Bermudez-Humaran, 2004). Un des meilleur exemple est le système NICE (nisine controlled expression), qui permet d'activer l'expression du gène d'intérêt uniquement en présence dans le milieu environnant d'une bactériocine « la nisine » (De Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers, 1998). La bactérie doit être pourvue des gènes *nisR* et *nisK* au sein de son génome. La protéine codée par *nisK* est un récepteur protéique transmembranaire spécifique de la nisine. Un domaine extracellulaire fixe spécifiquement la nisine présente dans le milieu environnant ce qui entraîne son autophosphorylation. Puis il y a un phototransfert sur la protéine codée par *nisR* libre dans le cytoplasme, transduction du signal dans le cytoplasme et activation de la transcription des gènes placés sous le contrôle du promoteur inductible P_{nisA}. Les gènes *nisR* et *nisK* sont intégrés au chromosome afin que leurs expressions soient constitutives et optimales au même titre que les gènes essentiels de la bactérie (Fig. 33) (Drouault *et al.*, 2000).

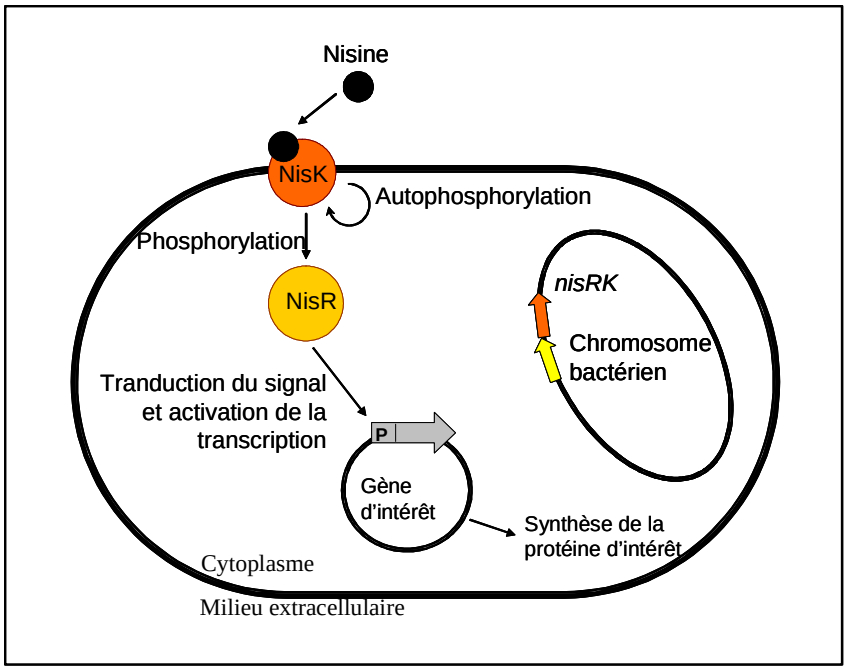


Fig. 33: Système d'expression NICE.

Ce système permet i) de contrôler la production de la protéine et donc de diminuer les effets secondaires liés à la surproduction et ii) d'augmenter jusqu'à 1000 fois l'expression du gène d'intérêt (De Ruyter *et al.*, 1996). Les promoteurs inductibles peuvent également avoir un intérêt dans le cadre de traitements de maladies intestinales telles que les MICI, si on prend l'exemple d'un promoteur inductible à un stress biliaire, ce dernier permettra de délivrer localement la protéine dans l'intestin, lors du passage de la bactérie au niveau du duodénum, permettant ainsi une action très localisée de la protéine et donc une efficacité plus importante.

Travaux effectués sur le genre Bifidobacterium

L'utilisation du genre *Bifidobacterium* en tant que vecteurs de protéines d'intérêt est encore peu exploitée. Ses capacités à s'adapter et à persister au sein du TD font de ce genre un candidat idéal mais les connaissances en génie génétique le concernant restent encore limitées. Peu de souches sont actuellement séquencées et les systèmes de sécrétion des protéines de bifidobactéries demeurent encore peu connus (MacConaill *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2008). La machinerie de sécrétion des bifides est proche des autres bactéries à Gram positif, exceptée l'absence de la voie de sécrétion SecDF. La présence de 3 SPases ont été identifiées chez *B. breve* ainsi que 3 sortases (MacConaill *et al.*, 2003).

De nombreux paramètres limitent l'exploitation des bifidobactéries en génie génétique. L'exigence nutritionnelle du genre bactérien et son système métabolique anaérobie rendent difficile la manipulation des bactéries. La présence de plusieurs plasmides intracellulaires limitent également son exploitation, divers plasmides ont ainsi été identifiés et ce, au sein de différentes espèces telles que *B. longum, B. asteroides, B. indicum* et *B. globosum* et *B.* breve (Sgorbati *et al*., 1982; Iwata and Morishita, 1989). Le pourcentage en haut GC de la paroi des bifidobactéries est également un facteur limitant, il réduit les possibilités de transformations (Schell *et al.*, 2002), en moyenne le taux de transformabilité atteint 10^3 transformants/µg d'ADN avec un maximum de 10^5 transformants/µg d'ADN pour la souche *B. infantis* MB208 (Rossi *et al.*, 1997). Enfin, un effet letal est observé lors des transformations utilisant des lactocoques et des lactobacilles probablement du fait d'un haut pourcentage en base GC des gènes des bifidobactéries, ainsi, il devient difficile d'effectuer des clonages intermédiaires chez d'autres BL (Lee and O'Sullivan, 2006; Martins *et al*., 2009). Tous ces paramètres reflètent le peu d'études effectuées sur *Bifidobacterium* en tant que vecteur de protéine d'intérêt santé.

Malgré cela, les capacités de *Bifidobacterium* restent très attractives et certaines équipes se sont penchées sur son utilisation dans les traitements potentiels de cancer. En effet, son exigence respiratoire fait de lui, la seule bactérie non pathogène capable de se développer au sein des régions hypoxiques des tumeurs et être actif métaboliquement. Plusieurs travaux ont ainsi démontré l'efficacité *in vivo* de l'utilisation de *B. longum* en tant que vecteur de la cytosine deaminase, enzyme permettant de convertir le 5 fluoro-cytosine (5-FC) (molécule non toxique) en 5 fluoro-uracil (5-FU) (molécule provoquant la mort des cellules cancéreuses) au sein même des tumeurs (Nakamura *et al.*, 2002). Ce traitement permet ainsi d'éviter un traitement systémique à base de 5-FU diminuant ainsi les effets secondaires tels que la mort des cellules saines. Cette stratégie permet également d'obtenir une action très localisée au sein même de la tumeur permettant ainsi d'agir plus efficacement (Fig. 34) (Yi *et al.*, 2005; Fujimori, 2006).

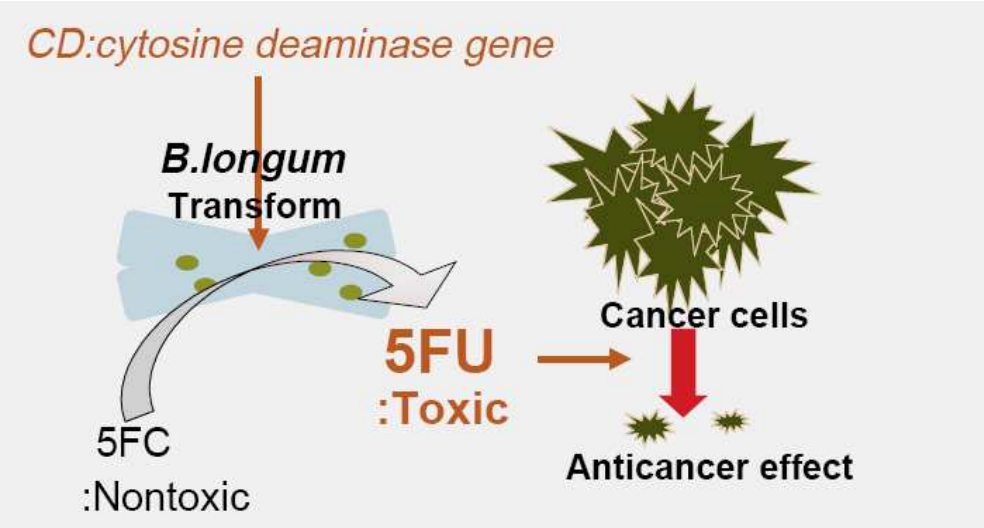


Fig. 34: Système de traitement de cancer du sein utilisant le genre *Bifidobacterium* en tant que vecteur de la cytosine deaminase (Fujimori, 2006).

Quelques études supplémentaires ont été effectuées en utilisant les bifidobactéries en tant que vecteurs de protéines thérapeutiques telles que l'IL-10 (Reyes Escogido and De Leon Rodriguez, 2007), l'endostatine (dans le traitement de cancer) (Li *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007) ou encore le « Fibroblast growth factor » (Shkoporov *et al.*, 2008). La plupart des constructions obtenues ne sont pas optimales et doivent être améliorées afin d'augmenter la sécrétion de la protéine hétérologue, le taux de transformabilité des bactéries ou encore faciliter la manipulation en génie génétique des bifidobactéries.

A travers cet objectif, les travaux menés par Yasui *et al.*, en 2009 ont permis d'augmenter d'un facteur 1000, la transformabilité de *B. adolescentis* en utilisant un plasmide de modification artificiel qui pré-méthyle le plasmide dans *E. coli* et permet ainsi d'éviter sa dégradation enzymatique dans la cellule (Yasui *et al.*, 2009). L'utilisation du PS d'arabinosidase a également permis augmenter de 50% la sécrétion de la protéine hIFN-α2b (Deng *et al.*, 2009). Pour autant, les systèmes de transformation et de sécrétion méritent d'être encore développés afin d'exploiter aux mieux les capacités de ce genre bactérien.

- **BLGM et MICI**

La recherche concernant l'utilisation de BLGM dans les traitements thérapeutiques des MICI est très prometteuse. Les travaux menés par l'équipe de L. Steidler concernant les effets anti-inflammatoires de *L. lactis* sécrétant l'IL-10 ont montré que l'administration de cette bactérie recombinante permettait de prévenir l'intégrité de l'épithélium intestinal et de

diminuer de 50% l'inflammation des colites murines induites par du DSS ainsi que des colites obtenus sur modèle de souris transgéniques KO IL-10 (Steidler *et al.*, 2000), leurs travaux se poursuivent par des essais cliniques chez l'homme, que je détaillerai dans la partie « Limite de la stratégie BLGM »

Plusieurs travaux se basant sur l'effet du stress oxydant dans les MICI ont également prouvé l'intérêt de l'utilisation des BLGM. Il a été démontré que deux souches de *L. lactis* et *Lb. plantarum* modifiées génétiquement pour produire une SOD à manganèse sous le contrôle du promoteur NICE, permet de diminuer significativement plusieurs paramètres caractéristiques de colites murines induites par du TNBS, tels que, la perte de poids des souris, les scores macroscopiques, les scores histologiques ainsi que les dosages de l'activité MPO (Han *et al.*, 2006). Dans ces travaux, la lyse des BLGM est nécessaire afin d'obtenir un effet sur la diminution de l'inflammation. Une deuxième étude démontre un effet de la souche recombinante *Lb. gasseri* produisant une SOD à manganèse sur un modèle de colite murine KO IL-10, mais contrairement à l'étude précédement citée, la survie de la souche recombinante est alors nécessaire afin d'obtenir l'effet anti-inflammatoire (Carroll *et al.*, 2007). Trois hypothèses concernant le mécanisme de la SOD produite par les bactéries sont alors émises, i) la SOD agit de manière directe avec l'environnement intestinal, pour cela la souche doit être lysée afin de délivrer la SOD dans le TD; ii) la SOD agit de manière indirecte en améliorant la survie de la souche mettant ainsi en avant son potentiel probiotique et lui permettant d'obtenir un contact plus étroit avec l'épithélium intestinal et iii) la SOD influence la composition du microbiote et diminue ainsi l'inflammation (Han and Fioramonti, 2008).

D'autres études permettent de montrer l'avantage de l'utilisation de BLGM. Prenons pour exemple les travaux de Foligné *et al.*, menés en 2007 qui ont utilisé les propriétés immuno-modulatrices d'une bactérie pathogène *Yersinia pseudotuberculosis* afin de prévenir et traiter des colites expérimentales (Foligne *et al*., 2007a). Dans cette étude, le gène codant pour la protéine de surface Lcrv de *Yersinia,* qui est capable d'inhiber le système immunitaire de l'hôte, a été cloné dans un plasmide sous le contrôle du promoteur constitutif et du PS_{Usp45} de *L. lactis.* L'administration intragastrique de la bactérie recombinante a permis de diminuer significativement des colites murines, d'un point de vue fondamental, il a été démontré que Lcrv stimule les macrophages afin de leur faire produire l'IL-10 *via* le TLR-2. Cette étude a permis i) d'étudier les mécanismes d'action de bactéries pathogènes sur le système immunitaire tels que *Yersinia*, et ii) de démontrer que l'utilisation de protéines de pathogènes

exprimées par des bactéries alimentaires peut avoir des effets spectaculaires dans le traitement de pathologies digestives.

L'ensemble de ces travaux permet de montrer les différentes fonctions des BLGM au sein de la recherche sur les MICI. En effet, elles permettent i) d'étudier le fonctionnement de certaines protéines sur le système immunitaire (SOD, Lcrv); ii) de rechercher de nouvelles protéines thérapeutiques dans le traitement des MICI et iii) de rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques de ces maladies en limitant les effets secondaires des traitements habituellement utilisés.

- **Limites de la stratégie BLGM**

Comme nous venons de le voir, l'utilisation de BLGM en tant que traitement des pathologies digestives peut devenir une bonne alternative aux traitements existants actuellement. Elle permet de diminuer l'inflammation tout en limitant les effets secondaires d'un traitement par voie systémique. A l'heure actuelle, leurs utilisations chez l'homme restent très limitées car elles soulèvent de nombreuses questions d'ordre éthique, environnementale et clinique. En effet, les limites concernant l'application de la stratégie BLGM chez l'homme comprennent principalement i) les risques de dissémination de la bactérie recombinante dans l'environnement ; ii) les risques du transfert du transgène au microbiote intestinal et iii) les risques de dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques permettant de sélectionner les bactéries ayant reçu le transgène lors de la construction de la souche.

L'équipe de L. Steidler s'est investie dans ce domaine afin de mettre au point une BLGM « propre » et non disséminable pouvant être utilisée chez l'homme. Pour cela, ils ont choisi de travailler avec une souche de *L. lactis* possédant le statut GRAS et ne persistant pas au sein de l'écosystème intestinal. Ils ont alors remplacé le gène *thyA* par la cassette d'expression de l'IL-10 *via* un double crossing-over au sein du génome bactérien. Le gène *thyA* codant pour la thymidylate synthase est un gène essentiel à la croissance de la bactérie dans un milieu sans thymidine. Cette modification stable au sein du génome bactérien ne fait pas intervenir de plasmide et évite ainsi le transfert de ce dernier au microbiote, de plus, la bactérie dépourvue de son gène est dépendante de l'apport en thymidine. Cette auxotrophie permet de contrôler la présence de la bactérie au sein du TD, d'interrompre le traitement si nécessaire et de limiter le risque de dissémination de la bactérie dans l'environnement. Enfin, si la bactérie parvient à

récupérer le gène *thyA* au sein du microbiote, alors elle perd automatiquement le transgène et récupère ainsi son phénotype sauvage (Steidler *et al.*, 2003).

La construction de cette bactérie, nommée *L. lactis* Thy12, a fait l'objet d'une étude chez le porc concernant les risques de dissémination et des effets secondaires possibles. Ils ont prouvé *in vitro* la stabilisation de la cassette IL-10, l'auxotrophie de la souche en thymidine et l'absence de transfert du gène *thyA* entre *L. lactis* Thy12 et une souche d'*E. coli thyA*+. Ils ont également démontré la non-dissemination de *L. lactis* Thy12 par le dénombrement des bactéries viables dans les fèces des animaux après administration de la souche sauvage *L. lactis* MG1363 et de la souche recombinante *L. lactis* Thy12 directement au sein de l'iléon de porc (Fig. 35).

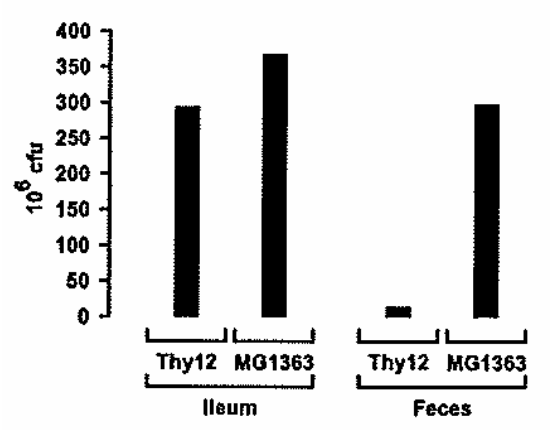


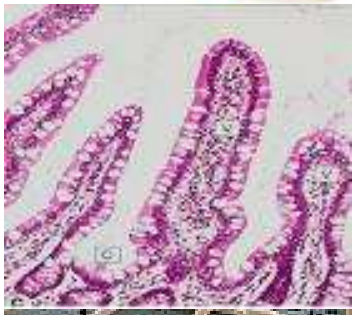
Fig. 35: Dénombrements dans l'iléon et les fèces de porc de *L. lactis* MG1363 et de *L. lactis* Thy12.

Ces travaux se sont alors poursuivis par un premier essai clinique (Phase I trial) dont l'objectif était de de confirmer l'inocuité de la souche. Cette étude a été effectuée sur 10 patients atteints de la MC qui ont ingéré des gélules contenant la bactérie recombinante appelée désormais AG011 (http://www.actogenix.com/eng/products/AG011.php). Ainsi, ils ont pu confirmer les résultats précédemment observés chez le porc, concernant l'absence de dissémination et d'effets secondaires chez l'homme (Braat *et al.*, 2006), en ce qui concerne les effets thérapeutiques de AG011 sur la MC, cette étude a permis de mettre en évidence des effets bénéfiques du traitements sur 8 des 10 patients. Enfin, AG011 fait actuellement l'objet d'un deuxième essai clinique (Phase II trial) sur des patients atteints de colites ulcéreuses actives. L'objectif de cet essai étant d'évaluer la tolérance et l'efficacité du traitement sur les patients *via* une analyse en double aveugle *vs* placebo de deux concentrations différentes d'AG011 (clinicaltrials.gov, 2009). Ces travaux, dont les résultats ne sont pas encore

communiqués devraient, s'ils s'avèrent positifs être les précurseurs d'une nouvelle méthode thérapeutique utilisant les BLGM.

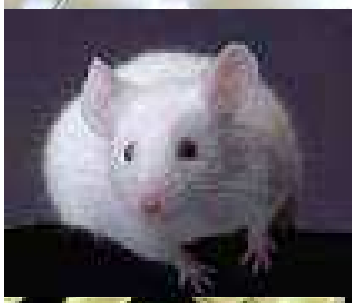
L'utilisation de probiotiques naturels ou recombinants a démontré tout son intérêt durant ces dernières années. Grâce au génie génétique, on est à l'heure actuelle capable d'étudier précisément les mécanismes d'action de certaines molécules et d'élucider ainsi certains mystères de la recherche. Quant à l'utilisation de BLGM en tant que traitements thérapeutiques, nous venons de voir que les récents travaux de Steidler et al., *ouvrent la perspective de l'utilisation de BLGM chez l'homme, de par leur efficacité, leur absence d'effets secondaires et de dissémination au sein de l'environnement. Il est cependant nécessaire d'encadrer ces utilisations d'un point de vue législatif afin d'éviter toutes dérives et ainsi limiter leur utilisation sur la base de thérapies concernant dans un premier temps des maladies pour lesquelles il n'existe aucun traitement.*













CHAPITRE 2 : RESULTATS

Les effets positifs de probiotiques ont été observés dans le traitement de désordres gastro-intestinaux comme l'intolérance au lactose, les infections et la prévention de la diarrhée. Ils ont également été testés dans la prévention et le traitement des MICI.
Les MICI sont des pathologies invalidantes et de longue durée, touchant 1 habitant / 1000. Elles se caractérisent par une inflammation anormale et récurrente du TD, dont les manifestations affectent fortement la qualité de vie des malades (douleurs abdominales, fièvre, malabsorption...). Les traitements existant sont lourds, onéreux et principalement suspensifs. La recherche de nouvelles pistes de prévention ou de thérapie a mis en évidence un intérêt potentiel de souches probiotiques vis-à-vis de ces pathologies digestives : d'une part, parce qu'elles peuvent constituer des vecteurs bactériens pour la libération, dans le TD, de protéines d'intérêt santé, d'autre part, parce que certaines souches bactériennes possèdent, par elles-mêmes, des propriétés anti-inflammatoires. C'est dans ce contexte que s'est situé mon travail de thèse dans lequel j'ai poursuivi deux principaux objectifs :

1) Optimiser des souches de BL en tant que vecteur de protéines d'intérêt santé. Pour cela, nous avons travaillé sur plusieurs types de vecteurs bactériens : i) les vecteurs traditionnellement utilisés à savoir des lactocoques, nous avons étudié trois souches présentant des résistances plus ou moins importantes au lysozyme et ii) des vecteurs plus originaux et moins utilisés, d'une part les lactobacilles qui rentrent dans la composition de certains produits fermentés et qui persistent plusieurs jours dans le TD et d'autre part, les bifidobactéries qui sont des bactéries commensales adaptées aux conditions particulières du TD.

2) Analyser les effets anti-inflammatoires de souches recombinantes ou commensales. Pour cela, nous avons étudiés i) le stress oxydant vis-à-vis de l'inflammation, par la construction puis l'analyse des effets anti-inflammatoires de souches de *Lb. casei* BL23 produisant des enzymes anti-oxydantes et ii) les effets anti-inflammatoires d'une bactérie commensale : *F. prausnitzii* A2-165.

I. OPTIMISATION DE SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES EN TANT QUE VECTEURS DE PROTEINES D'INTERET SANTE

L'utilisation de BL recombinantes pour délivrer des protéines d'intérêt santé au niveau mucosal constitue une stratégie attractive qui est très étudiée depuis une dizaine d'années (Hanniffy *et al.* 2004; Nouaille *et al.* 2006). La stratégie est en effet prometteuse, puisqu'il s'agit d'utiliser des vecteurs non pathogènes tels que les BL prévenant ainsi de nombreux effets secondaires liès à l'utilisation alternative de souches atténuées de bactéries pathogènes. Les lactocoques sont les BL les plus utilisées en tant que vecteur de protéines d'intérêt santé (Steidler *et al.* 2000; Bermudez-Humaran 2004). Cependant, il n'existe que peu d'études tentant d'optimiser l'administration *in situ* de protéines d'intérêt santé par la manipulation des vecteurs bactériens. Ainsi, si l'on veut cibler des pathologies digestives, il peut être aussi intéressant d'élargir le choix du vecteur bactérien à d'autres genres que le lactocoque.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi d'étudier i) des lactocoques dont la résistance à la lyse est plus ou moins importante, en supposant que ce paramètre puisse jouer un rôle important sur la libération des molécules d'intérêt durant leur transit dans le TD et ii) des lactobacilles et des bifidobactéries, dont les propriétés sont plus adaptées que les lactocoques aux conditions environnementales du TD. L'efficacité de l'administration de protéines d'intérêt par ces différents vecteurs a été analysée en évaluant la réponse immunitaire d'une protéine d'intérêt santé : l'antigène E7 du papillomavirus humain de type 16 (HPV-16).

1) Expression et purification de l'antigène E7 de l'HPV-16, protéine modèle pour l'étude de la réponse immunitaire chez la souris

- **Présentation du virus HPV-16 et de l'antigène E7**

Le cancer du col de l'utérus est la deuxième cause de mortalité des femmes dans le monde. L'infection causée par l'HPV-16 représente le facteur majoritaire associé au développement de ce cancer (zur Hausen, 1991).

L'HPV-16 fait partie de la famille des *papovaviridae*. Son génome est constitué d'environ 8000 pbs, sa capside de forme icosaédrique est formée à partir de deux protomères L1 et L 2 qui s'associent en 72 capsomères (douze pentons et soixante hexons). Ce virus est dépourvu d'enveloppe et sa taille est de l'ordre de 50 nm (Fig. 36).

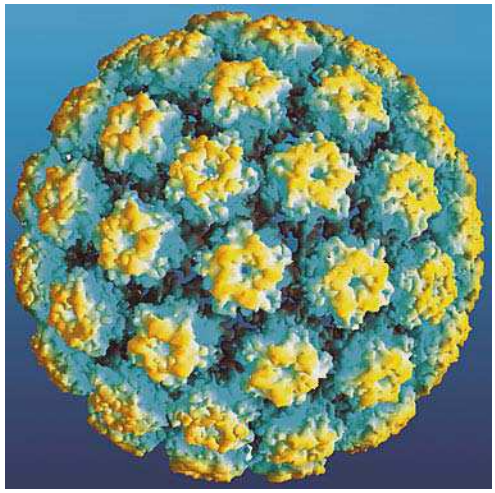


Fig. 36: Structure de la capside de l'HPV-16.

L'Ag E7 est exprimé depuis les cellules eucaryotes infectées par l'HPV-16 et contribue ainsi au développement du phénotype malin. L'Ag E7 est une phosphoprotéine composée de 98 acides aminés, de masse moléculaire 19 kDa et dépourvue d'activité enzymatique (Smotkin and Wettstein, 1986). Elle possède un domaine de liaison au zinc à l'extrémité COOH terminale impliqué dans la stabilité de la protéine. Du côté NH_2 terminal, on retrouve une petite région analogue à celle de la protéine E1A des adénovirus et de l'Ag T des polyomavirus, impliquée dans la perturbation du cycle cellulaire. C'est ainsi, que l'Ag E7 interagit avec plusieurs composants cellulaires et notamment des protéines suppresseurs de tumeur telles que Rb (protéine du retinoblastome), déréglant ainsi le cycle cellulaire des cellules épithéliales et provoquant leurs multiplications anarchiques (Fig. 37) (Baker *et al*., 1987; Dyson *et al*., 1989; Tanaka *et al*., 1989; Zwerschke and Jansen-Durr, 2000). C'est au travers de ce processus que la protéine E7 participe à la prolifération et à l'immortalisation de la cellule infectée induisant le développement du cancer.

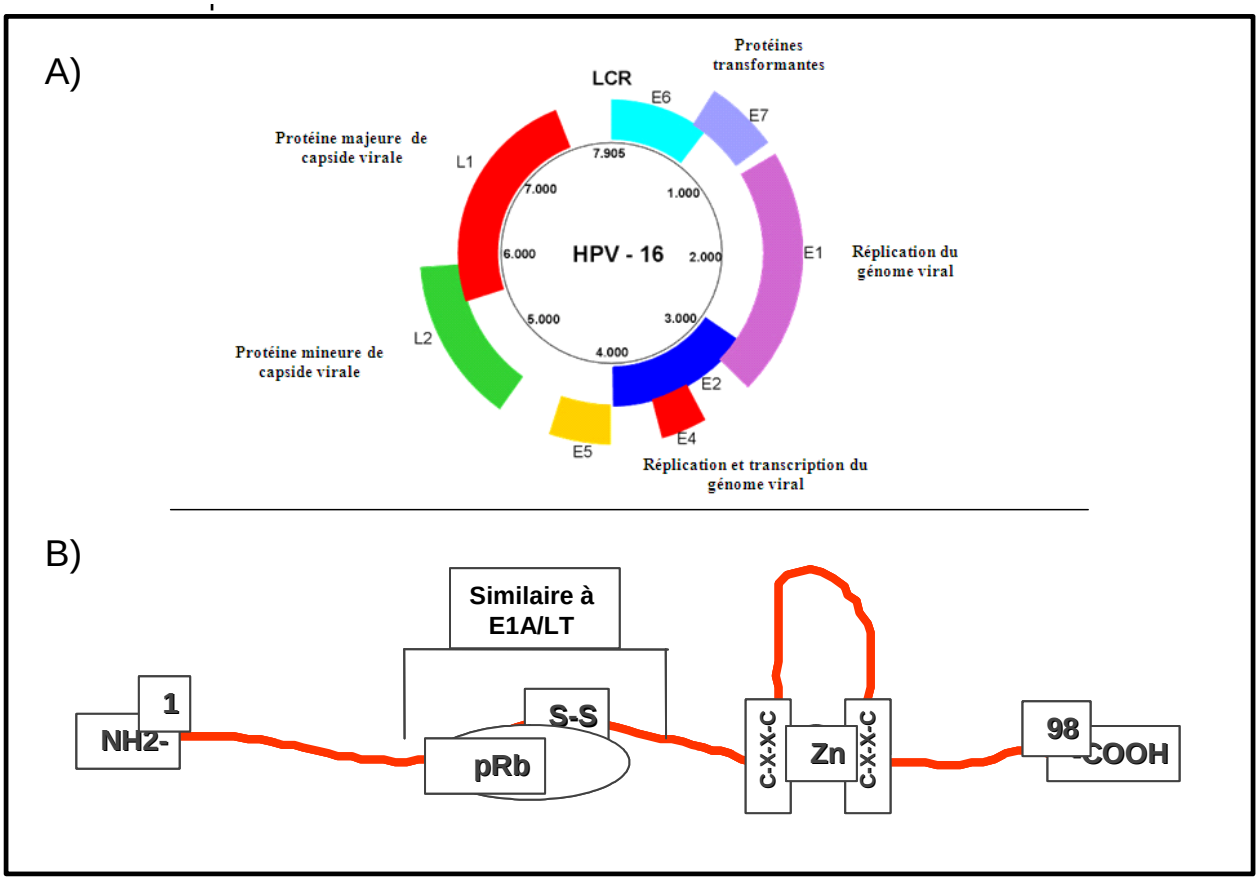


Fig. 37: Organisation génétique de l'HPV-16 (A) et structure de la protéine E7 (B).

Bien que la protéine E6 soit également impliquée dans le processus, les études ont démontré que le transcrit de E7 et sa protéine sont plus abondants (Smotkin and Wettstein, 1986). En conséquence, la protéine E7 semble être le candidat le plus adapté pour étudier la réponse immunitaire et développer de nouveaux vaccins contre l'HPV-16. Lors d'une immunisation induite par la présence de la protéine au sein de l'organisme, ce dernier va activer des macrophages, des LT et induire des Ac dirigés spécifiquement contre la protéine virale E7. De précédentes études concernant les mécanismes de la réponse immunitaire induite par l'HPV-16 restent ambiguës, il semblerait que l'ensemble des voies Th1 et Th2 interviennent, notamment par l'augmentation des cytokines telles que l'IFN-γ (appartenant au groupe Th1) et l'IL-5 (appartenant au groupe Th2) (de Jong *et al.*, 2004; Warrino *et al.*, 2004; Warrino *et al.*, 2005). Lors de nos travaux, nous avons choisi d'analyser plus spécifiquement ces deux cytokines caractéristiques de la réponse immunitaire induite par l'antigène E7.

Les systèmes de production d'E7 ont dans un premier temps été développés au sein des cellules eucaryotes mais sa dégradation rapide (30 à 40 min) provoquée par le protéasome (Reinstein *et al.*, 2000), rend difficile son exploitation. Depuis 1990, plusieurs travaux ont

exploré l'utilisation de bactérie comme vecteur de délivrance de l'antigène E7 mais la protéine étant très labile, elle est rapidement dégradée au sein du cytoplasme des bactéries (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002; Bermudez-Humaran *et al.*, 2003). De récentes études ont montré que le gène codant pour l'Ag E7 fusionné à un PS de lactocoque ou à une protéine stable telle que la nucléase, permettait de stabiliser sa production et de la rendre exploitable, bien que sa persistance au sein de l'environnement extérieur n'excède pas quelques jours (Bermudez-Humaran *et al.* 2002; Bermudez-Humaran *et al.* 2003).

Nos travaux portent sur le développement d'une technique permettant la purification de la protéine E7 produite par un hôte procaryote. L'originalité de cette étude tient dans le fait que notre construction évite la dégradation de la protéine permettant ainsi de la conserver pendant plusieurs mois.

- **Matériels et Méthodes**

Souches bactériennes et plasmides utilisés

L'espèce bactérienne utilisée pour les constructions est *E . coli* qui est cultivée dans le milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C avec agitation. Les souches et plasmides utilisés sont décrits dans les tableaux ci-dessous, les clones recombinants sont sélectionnés par l'addition d'ampicilline (100 µg/ml).

Souches	Culture	Références
E. coli CYS21	37°C avec agitation	Stabyexpress, Delphi Genetics, Eurogentec.
E. coli SE1	37°C avec agitation	Stabyexpress, Delphi Genetics, Eurogentec.

Fig. 38: Souches utilisées.

Plasmides	Resistance	Références
E. coli CYS21	37°C avec agitation	Stabyexpress, Delphi Genetics, Eurogentec.
E. coli SE1	37°C avec agitation	Stabyexpress, Delphi Genetics, Eurogentec.
pCYT : E7	Chloramphenicol	(Bermudez-Humaran *et al.*, 2002)
pCR-Topo	Ampicilline	Invitrogen, Carlsbad, Calif.
pStaby-1.2	Ampicilline	Stabyexpress, Delphi Genetics, Eurogentec.
pCR-Topo E7 his	Ampicilline	Cette étude
pStaby : E7	Ampicilline	Cette étude

Fig. 39:Plasmides utilisés.

Techniques de manipulation de l'ADN

L'ADN plasmidique est isolé selon la procédure décrite par Sambrook *et al.*, en 1989. L'amplification par PCR a été effectuée avec un thermal cycler (Applied Biosystem) utilisant la Vent DNA polymerase (Promega). Les séquences d'ADN sont analysées par la compagnie MWG (Genomic Company, Allemagne).

Utilisation d'un système d'expression T7

Le gène d'intérêt codant pour l'Ag E7 est placé sous le contrôle du promoteur T7 lui-même induit par la T7 RNA polymérase (T7p). Le gène codant pour T7p est intégré au chromosome de la souche *E. coli* SE1 sous le contrôle du promoteur *lac*UV5 ainsi que de l'opéron *lac*. L'ensemble de ce système est réprimé par l'opéron *lacO* présent au sein du chromosome bactérien et dans le plasmide pStaby1.2 où sa séquence est comprise entre la séquence codant pour le gène d'intérêt et celle codant pour le promoteur T7 permettant ainsi de réprimer l'expression du gène d'intérêt. L'addition d'Isopropy β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) au sein du milieu environnant permet de réprimer l'opéron *lacO* et active ainsi l'expression de T7p et donc de l'antigène E7.

L'intérêt de ce système réside dans l'utilisation de deux souches bactériennes différentes, l'une contenant l'ensemble du système d'expression T7 et permettant ainsi l'expression de la protéine d'intérêt (*E. coli* SE1), la deuxième (*E. coli* CYS21) permettant le clonage intermédiaire dans laquelle le gène codant pour T7p est absent, empêchant ainsi l'expression

du gène d'intérêt car le promoteur T7 est uniquement induit par T7p et ne peut en aucun cas être induit par une RNA polymerase provenant de l'hôte *E. coli*.

Stabilité du plasmide pStaby :E7

Les souches *E. coli* SE1 et *E. coli* CYS21 contiennent au sein de leur chromosome le gène *ccdB* codant pour un poison entraînant la mort de la bactérie. Le plasmide pStaby 1.2 contient le gène *ccdA* codant pour l'antidote, l'expression du gène *ccdB* est ainsi fortement réprimée par la présence du plasmide.
Ce système rend la bactérie auxotrophe vis-à-vis du plasmide ce qui permet i) de stabiliser sa présence au sein de la bactérie et ii) d'éliminer le système de sélection du plasmide par l'ajout d'antibiotique.

Construction de la souche recombinante E. coli *SE1 produisant l'antigène E7*

La cassette correspondant à la séquence codant pour l'Ag E7 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pCYT:E7 (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002) *via* l'utilisation des amorces 5'-E7-Staby (5'-CC***GCTAGC***CATGGAGATACACCTACATTGC-3') pour le brin sens et 3'-E7-Staby (5'-GG***CTCGAG***TGGTTTCTGAGAACAGATGG GG-3') pour le brin antisens. Le fragment résultant de la PCR (301 pb) a été cloné *via* le kit pCR-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, Calif) formant ainsi le plasmide pCR-TOPO: E7-his. Ce dernier a alors été digéré par les enzymes de restriction *Nhe*I-*Xho*I puis purifié et cloné dans le vecteur pStaby 1.2 précédemment digéré par les enzymes de restriction *Nhe*I-*Xho*I. Le vecteur pStaby 1.2 a la particularité de permettre la fusion du 6-résidu histidine à l'extrémité C-terminal de la protéine (StabyExpress Delphi Genetics, Eurogentec). De ce clonage, résulte le plasmide pStaby:E7 dont la séquence a par la suite été analysée par la société MWG (Fig. 40). Une fois la séquence confirmée, le plasmide pStaby:E7 a été introduit chez *E. coli* CYS21 puis chez *E. coli* SE1 selon les instructions du fournisseur (StabyExpress, Delphi Genetics).

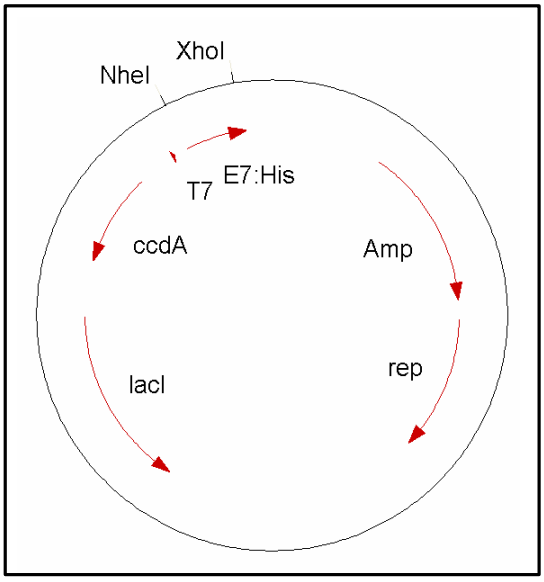


Fig. 40: Carte du plasmide pStaby :E7.

Purification de l'antigène E7

La protéine E7-his est purifiée selon le protocole suivant:
100 ml d'une culture de 24 h est utilisé afin d'inoculer 5 L de milieu LB enrichi avec l'ampicilline, puis mis à incuber à 37°C en agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique d'environ 0,6 à 600 nm. Les cellules bactériennes sont alors induites par l'addition d'IPTG 100 µM pendant 3 h à 37°C. Après suspension du culot bactérien dans du tampon Tris-buffer (100 mM Tris, 50 mM KCl, pH 7,5), les cellules sont cassées par sonication (3 cycles de 15 s, 2 cycles de 10 s, 2 cycles de 5 s, dans la glace ; Bioblock Vibracell, 100 W) puis centrifugées à 45000 rpm à 4°C pendant 45 min. Le surnageant est alors passé sur une colonne Ni-NTA Sepharose (Qiagen) équilibré avec du tampon Tris-buffer, pH 7,5. La colonne est alors lavée avec le même tampon, puis les protéines sont éluées par plusieurs étapes de lavages utilisant une solution d'imidazole 25 mM et 75 mM. La protéine E7 est alors éluée par l'addition d'une solution d'imidazole à 500 mM puis conservée à -80°C.

Analyse de l'antigène E7 purifié par Western blot et bleu de Coomassie

Toutes les fractions obtenues lors de l'étape de purification de la protéine sont alors analysées par Western blot et bleu de Coomassie. Les protéines migrent sur un gel d'électrophorèse polyacrylamide (12%) puis sont soit analysées par la coloration bleu de Coomassie, soit transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Amersham Biosciences,

Saclay, France) pour l'analyse en Western blot. Après une étape de saturation effectuée avec du tampon TBS-T supplémenté avec 10% de lait en poudre, les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C avec un mixte d'anticorps primaire constitué des anticorps HPV-16 monoclonal et polyclonal IgG d'origine chèvre ainsi que l'anticorps HPV-16 monoclonal IgG1 d'origine souris (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA; 1/500). Suite à une étape de lavage avec du tampon TBS-T, les membranes sont incubées 1 h avec un second anticorps couplé à la péroxydase (Protéine G-HRP ; Biorad). Le signal est alors détecté *via* l'utilisation du kit ECL (Amersham Biosciences).

Quantification de l'antigène E7 purifié

La quantification de l'antigène E7 purifié est effectuée par la méthode de Bradfort (Bradford, 1976) utilisant de l'albumine bovine pour la gamme étalon.

- **Résultats - Discussions**

Purification de la protéine E7

Les résultats obtenus (Cf. Fig. 41 et Fig. 42) démontrent la pureté de la protéine E7 purifiée ainsi que sa stabilité à travers le temps. Il est possible que l'ajout de la séquence histidine à l'extrémité C- terminale de la séquence de la protéine permette de protéger cette dernière contre la dégradation. Ces travaux permettent d'obtenir une méthode efficace de production stable d'une protéine recombinante labile permettant ainsi son exploitation au cours du temps.

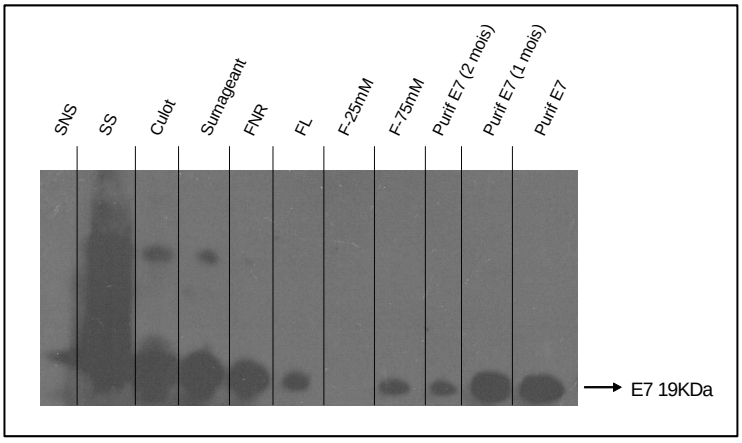


Fig. 41: Analyse de la purification d'E7 par Western Blot.

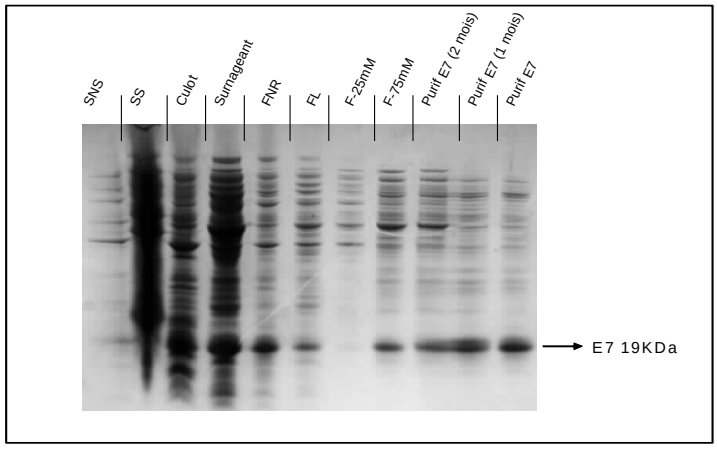


Fig. 42: Analyse de la purification d'E7 par bleu de coomassie.

Les figures n° 41 et 42 représentent les dépôts des différentes fractions obtenues lors de la purification de l'Ag E7 produit par le plasmide pStaby :E7 contenu dans la souche *E. coli* SE1. Dans l'ordre, les dépôts sont les suivants :

- La souche bactérienne *E. coli* SE1 contenant le plasmide pStaby :E7 non soniquée (SNS)
- la souche bactérienne *E. coli* SE1 contenant le plasmide pStaby :E7 après l'étape de sonication (SS),
- le culot obtenu suite à l'étape de centrifugation (Culot),
- le surnageant obtenu suite à l'étape de centrifugation (Surnageant),
- la fraction non retenue lors de l'étape de purification (FNR),
- la fraction de lavage (FL),
- les fractions d'élutions correspondantes aux différentes concentrations d'imidazol utilisées (F-25mM et F-75mM),
- les solutions contenant la protéine purifiée dans la solution d'imidazol 500mM en fonction de leur ancienneté à savoir, deux mois de conservation à -80°C (Purif E7 (2 mois)), un mois de conservation à -80°C (Purif E7 (1 mois)) ou réalisée immédiatement après la purification (purif E7).

Quantification de la protéine E7

La quantification des trois purifications effectuées donne un rendement moyen de 4,7 mg de protéine purifiée par litre de culture.

Avantage de la technique utilisée

L'utilisation du système d'expression T7 représente de nombreux avantages, tout d'abord l'utilisation de la souche *E. coli* CYS21 réprimant la production du gène d'intérêt permet de cloner des protéines hétérologues potentiellement toxiques pour l'hôte telles que des interleukines et cela sans ajout d'antibiotique. Il permet également d'augmenter la production du gène d'intérêt de 3 à 5 fois. Enfin la technique est transférable à d'autres genres bactériens que *E. coli* et est fonctionnelle sur différents milieux de culture.

La mise en place de ce protocole nous a permis d'étudier la réponse immunitaire induite par l'antigène E7 de l'HPV-16 chez le modèle murin lors de nos travaux concernant l'étude de l'influence des vecteurs bactériens pour délivrer les protéines d'intérêt santé : Cf. articles « Variations of N-acetylation level of peptidoglycan do not influence persistence of *Lactococcus lactis* in the gastrointestinal tract » et « Bifidobacteria as a new vector for mucosal delivery of therapeutic proteins »

Mes travaux concernant la construction du plasmide pStaby :E7 et sa purification seront valorisés dans une note et feront ainsi l'objet d'une soumission probable au journal « Biotechniques »

2) Influence de la lyse sur la réponse immunitaire

- **Contexte de l'étude**

Il est clairement défini que l'environnement du TD est un réel obstacle à la survie des souches en transit. Leur résistance à la lyse et notamment au lysozyme sécrété par les cellules de Paneth au sein de la muqueuse intestinale peut être un facteur décisif concernant leur viabilité. De nombreuses recherches ont également démontré l'importance du vecteur bactérien dans le taux de libération de protéines d'intérêt (Cortes-Perez *et al.*, 2007). Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, les travaux de Grangette *et al.*, menés en 2004, ont permis d'émettre l'hypothèse que la lyse bactérienne permettait d'augmenter les capacités de vectorisation des BLGM (Grangette *et al.*, 2004). Tous ces paramètres démontrent à quel point les capacités de vectorisation des BL peuvent intervenir dans l'action de la protéine d'intérêt *in situ.* C'est à travers ce contexte que nous avons souhaité étudier l'influence de la lyse bactérienne sur la réponse immunitaire. Pour cela, nous avons tenté de répondre à la question : « la résistance de *L. lactis* vis-à-vis de la lyse *in vitro* peut-elle influencer la stimulation du système immunitaire par l'Ag E7 de l'HPV-16? »

- **Objectifs et stratégies**

Nous avons choisi de travailler avec la souche *L. lactis* NZ9000 produisant l'Ag E7 au sein du cytoplasme car il a été précédemment démontré que cette construction ne permettait pas d'induire de réponse immunitaire spécifique (Bermudez-Humaran *et al.*, 2004). Nous pouvions ainsi étudier i) si les capacités de vectorisation en étaient affectées par la résistance ou la sensibilité au lysozyme et ii) si la survie de la bactérie au sein du TD était nécessaire à l'action de l'Ag E7.

La résistance de *L. lactis* vis-à-vis du lysozyme a été modifiée par l'inactivation ou la surexpression du gène *pgdA* codant pour l'enzyme peptidoglycane déacétylase qui catalyse la réaction de déacétylation des osamines du PEG et empêche ainsi la fixation du lysozyme sur la paroi bactérienne (Meyrand *et al.*, 2007). Après vérification des capacités de résistance au

lysozyme des souches mutantes *in vitro*, la réponse immunitaire spécifique envers l'Ag E7 a été mesurée après une immunisation *in vivo* utilisant le modèle murin.

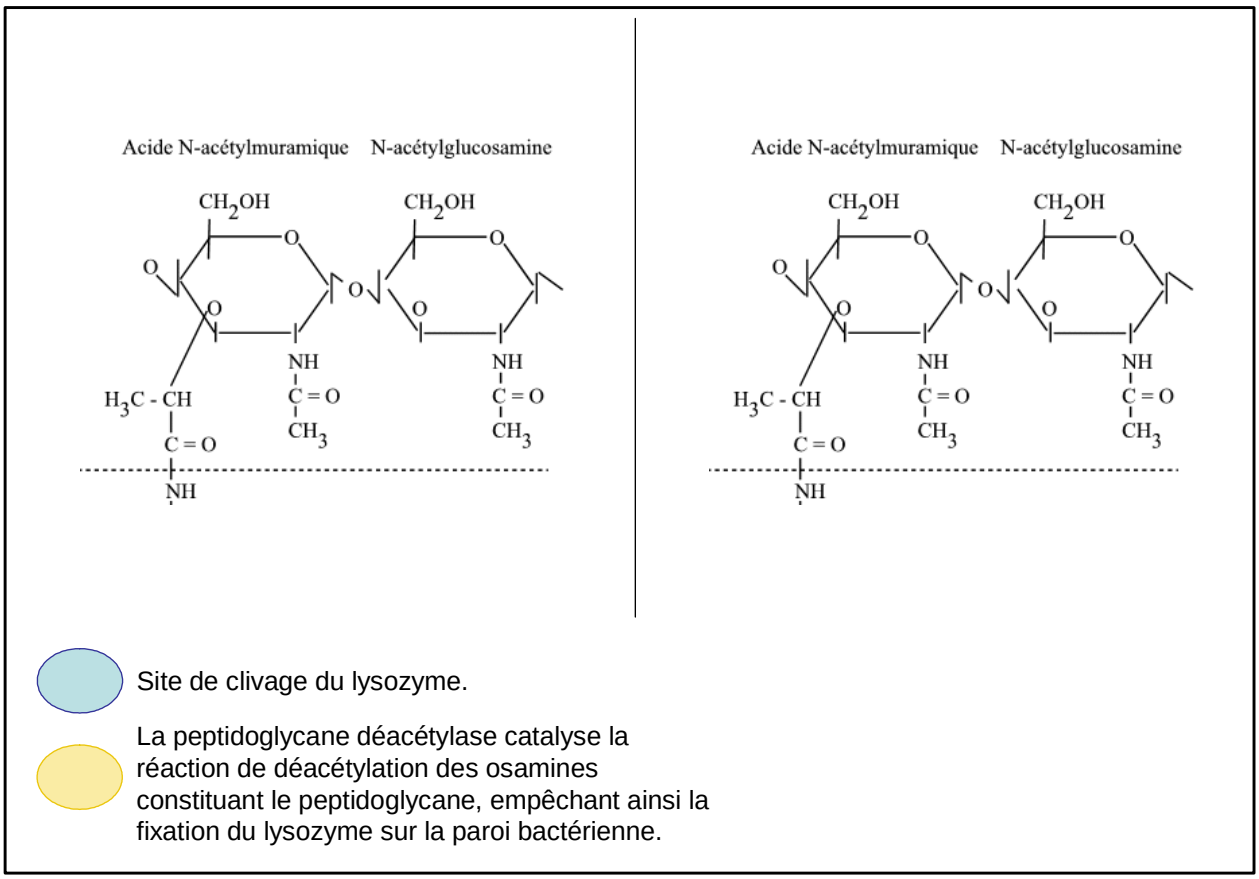


Fig. 43: Structure du PEG et mode d'action du lysozyme et de la peptidoglycane déacétylase.

- **Résultats**

Les résultats sont présentés dans l'article "Variations of N-acetylation level of peptidoglycan do not influence persistence of *Lactococcus lactis* in the gastrointestinal tract" p°99.

- **Conclusions et perspectives**

Les mutants obtenus possèdent une capacité de résistance au lysozyme *in vitro* qui diverge de la souche sauvage. Pour autant, cette étude n'a pas permis de démontrer un quelconque avantage des mutants testés vis-à-vis d'autres stress rencontrés *in vivo* tel que les stress biliaires ou oxydants ainsi que dans la survie des souches au sein du TD. De même, les réponses immunitaires induites par nos mutants et la souche sauvage ne permettent pas de conclure sur un éventuel effet de la lyse concernant l'immunogénicité de l'Ag délivré.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la résistance au lysozyme obtenu *in vitro* n'est pas suffisamment élevée afin d'induire une survie plus importante *in vivo*. De plus, il est important de prendre en compte l'environnement complexe qu'est le TD, la présence de milliards de bactéries, la sécrétion par ces mêmes bactéries ainsi que par les cellules de l'hôte de composants anti-microbiens ou encore le pH acide et « l'inhospitalité » de la muqueuse intestinale. L'ensemble de ces paramètres a probablement joué un rôle concernant la viabilité des souches. La résistance au lysozyme n'est donc pas un facteur suffisant pour augmenter les capacités de survie d'une bactérie *in situ* et cela peut expliquer que le potentiel de vectorisation de nos souches n'ait pas été augmenté. Une autre hypothèse permettant d'expliquer nos résultats peut également être émise : en admettant que l'antigène E7 soit délivré *in situ* lorsque la bactérie est lysée, il est fortement probable que ce dernier n'ait pas résisté aux attaques permanentes de l'environnement intestinal entraînant ainsi sa dégradation avant même de pouvoir agir sur le système immunitaire.

Ces travaux nous ont permis de conclure sur le fait que la modification du PEG de la paroi bactérienne de *L. lactis* induisait une sensibilité au lysozyme *in vitro* mais ne conférait aucun avantage concernant i) la résistance à d'autres stress rencontrés *in vivo*; ii) à la survie au sein du TD et iii) l'amélioration des capacités de vectorisation des lactocoques. Ces résultats nous ont également permis de développer une nouvelle perspective, à savoir, l'étude de genres bactériens dont la capacité d'adaptation *in vivo* est supérieure à celle de *L. lactis.* Nous nous sommes ainsi intéressés à *Lb. plantarum* et *B. infantis*, espèces bactériennes qui possèdent la capacité de persister plus longtemps au sein du TD permettant peut-être d'augmenter ainsi l'immunogénicité de l'Ag délivré.

- **Article : Variations of N-acetylation level of peptidoglycan do not influence persistence of *Lactococcus lactis* in the gastrointestinal tract**

Variations of N-acetylation level of peptidoglycan do not influence persistence of *Lactococcus lactis* in the gastrointestinal tract

Laurie Watterlot,[a] Mickael Meyrand,[b] Nicolas Gaide,[a] Sébastien Blugeon,[a] Jean-Jacques Gratadoux,[a] Maria-José Flores,[a] Philippe Langella,[a] Marie-Pierre Chapot-Chartier,[b] Luis G. Bermúdez-Humarán[a,*]

[a] INRA 0910, Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif and [b] INRA,UR477 Biochimie Bactérienne, F-78350, Jouy-en-Josas, France.

E-mail adresses:

LW:laurie.watterlot@jouy.inra.fr
MM:mickael.meyrand@jouy.inra.fr
NG:nikogaide@hotmail.com
SB:sebastien.blugeon@jouy.inra.fr
JJG:jean-jacques.gratadoux@jouy.inra.fr
MJF:maria.flores@jouy.inra.fr
PL:philippe.langella@jouy.inra.fr
MPCC:Marie-Pierre.Chapot@jouy.inra.fr
*LGBH:luis.bermudez@jouy.inra.fr

*Corresponding author. Mailing address: Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France. E-mail: luis.bermudez@jouy.inra.fr Phone: +33-134-65-24-63 Fax: +33-134-65-24-62.

Keywords : *Lactococcus lactis*, peptidoglycan, lysozyme, gastrointestinal tract, E7 antigen, *pgdA*.

ABSTRACT

Lactococcus lactis is a Gram-positive bacterium that produces peptidoglycan (PG) N-acetylglucosamine deacetylase (PgdA), one enzyme involved in cellular autolysis. We previously showed that inactivation of *pgdA* gene in *L. lactis* led to fully acetylated PG (resulting in a lysozyme-sensitivity phenotype), whereas cloning of *pgdA* gene on a multicopy plasmid vector led to an increased degree of PG deacetylation (resulting in a lysozyme-resistant phenotype) (Meyrand *et al.,* 2007). In order to test whether the lysozyme resistance may influence i) the persistence of *L. lactis* in the gastrointestinal tract (GIT) and ii) the ability of *L. lactis* to deliver therapeutic proteins *in vivo,* we constructed a wild-type, a lysozyme-resistant and a lysozyme-sensitive *L. lactis* strain producing E7 model antigen. No difference was found between these three lactococci strains regarding *in vitro* resistance tests to bile salts and oxidative stresses. Moreover, no difference in either the persistence level of these strains or the antigen-specific immune response evoked was observed after intragastric administration of these strains to mice. Our results suggest that either *pgdA* inactivation or overexpression in *L. lactis* leading to different levels of PG deacetylation do not confer any advantage in both the persistence in GIT and proteins delivery vector abilities.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are non-pathogenic and non-invasive Gram-positive microorganisms considered as good candidates for controlled and targeted administration of vaccine antigens to the mucosal immune system (Bermúdez-Humarán *et al*., 2004; Hanniffy *et al*., 2007). *Lactococcus lactis*, the model LAB, does not persist in the gastrointestinal tract (GIT) of either humans or mice (Gruzza *et al*., 1992; Vesa *et al*., 2000; Medaglini *et al*., 2001). However, the suitability of *L. lactis* as a delivery vector of proteins of interest (e.g. antigens, cytokines, and hormones) has been clearly established in the last decade *in vivo* (Steidler *et al*., 1998; Bermúdez-Humarán *et al*., 2009; Fernandez *et al*., 2009; Lee *et al*., 2009). The persistence of *L. lactis* in the GIT may depend on its ability to resist to lysis induced by endogenous or exogenous peptidoglycan (PG) hydrolases (PGHs). Bacteria produce enzymes, named autolysins, which are able to hydrolyze their own cell wall PG and lead to bacterial autolysis. Bacteria can also lyse as a result of the activity of exogenous PGHs such as lysozyme, which is especially produced in the GIT, as a first line of defense of the host against pathogens.

We recently showed that a PG modification, N-acetylglucosamine deacetylation, modulates the activity of the major autolysin AcmA in *L. lactis* and enhances lysozyme sensitivity. The overexpression of PG deacetylase (*pgdA*) resulted in i) an increase of the PG deacetylation level and in ii) a decrease susceptibility of PG to AcmA and iii) a decreased sensitivity to lysozyme (Meyrand *et al*., 2007). In addition, Grangette *et al.* (2004) previously demonstrated that inactivation of alanine racemase (an enzyme that participates in the cell wall synthesis) in *L. lactis* and *Lactobacillus plantarum* enhances the potential of these strains as mucosal delivery vectors. In order to test whether either a lysozyme-resistant or lysozyme-sensitive phenotype may have a role in the persistence in the GIT and on the ability of *L. lactis* to deliver therapeutic proteins *in vivo*, we constructed two *L. lactis* strains with different levels of PG deacetylation and producing an intracellular form of the human papillomavirus type-16 (HPV-16) E7 protein. We then analyzed the antigen-specific immune response evoked by these recombinant strains after intragastric administration to mice.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *L. lactis* was grown in M17 medium supplemented with 0.5% glucose at 30°C without shaking. *Escherichia coli* was grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C with vigorous shaking. Unless otherwise indicated, plasmid constructions were first established in *E. coli* and then transferred to *L. lactis* by electrotransformation (Sambrook *et al*., 1989; Langella *et al.*, 1993). Plasmids were selected by addition of antibiotics, as follows: erythromycin (2,5 µg/ml) and chloramphenicol (5 µg/ml) for *L. lactis* and chloramphenicol (10 µg/ml) or ampicillin (100 µg/ml) for *E. coli.*

2.2. Construction of L. lactis *strains with different level of de-N-acetylation and producing E7 antigen*

Two different *L. lactis* strains were constructed: a mutant *pgdA* strain and a *pgdA*-overexpressing strain. The gene *pgdA* (*xynD*) was inactivated in *L. lactis* strain JIM7049 by single crossing-over plasmid integration essentially as described previously (Meyrand *et al*., 2007). Briefly, an internal *pgdA* fragment was PCR-amplified with primers 5'-TACCTTGCTTATAGGAG CG-3' and 5'-CAGGCTTGGGCTTGTTTTC-3', using IL1403 DNA as template. The resulting 597 bp fragment was cloned into *Nco*I and *Sac*I restriction sites of the pJIM2242 plasmid vector (a non-replicative plasmid in *L. lactis*). The resulting plasmid was used to transform *L. lactis* JIM7049. An erythromycin-resistant clone was selected and named LLpgdA$^-$.

Overexpression of *pgdA* was obtained by cloning *pgdA* gene into pJIM2279 multicopy plasmid vector essentially as described previously (Meyrand *et al*., 2007). A 1351 bp DNA fragment encoding *pgdA* with its putative promoter and terminator was amplified by PCR from IL1403 total DNA with primers 5'-AAACTGCAGGGATATGTTAA GATAGGAGG-3' (*Pst*I site underlined) and 5'-ATATGCGGCCGCTCAAGTTTCCCATAAGTTGTC-3' (*Not*I site underlined). The fragment was digested with *Pst*I and *Not*I and cloned into a *Pst*I/*Not*I-linearized pJIM2279 vector. The resulting plasmid was used to transform JIM7049

strain resulting in LLpgdA$^+$. As a negative control we used JIM7049 strain transformed with pJIM2279 empty plasmid (LL). To produce E7 antigen, pCYT:E7 plasmid (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002) was introduced into the different *L. lactis* strains to obtain: LLpgdA$^-$(E7), LLpgdA$^+$(E7) and LL(E7). Clones were selected by the addition of chloramphenicol at 10µg/ml and erythromycin at 2.5 µg/ml. E7 production was evaluated by Western blot analysis of whole-cell proteins extracts as previously described (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002).

2.3. Lysozyme sensitivity

L. lactis strains were grown in M17 medium supplemented with glucose at 0.5% (GM17) in either presence or absence of lysozyme (Sigma, 0 mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml and 3 mg/ml) and the growth was observed after 48 hours at 30°C.

2.4. Analysis of tolerance to bile salts and oxidative stress

To determine the ability of LL(E7), LLpgdA$^-$(E7) and LLpgdA$^+$(E7) strains to survive at high concentrations of bile, the different lactococcal strains were grown in the presence of two bile salt concentrations, 0.075 and 0.1% (sodium cholate and desoxycholate acid, SIGMA). After 3 h of incubation at 37°C, viability was estimated by enumeration of bacteria using a spiral plater. We also determined the ability of LL(E7), LLpgdA$^-$(E7) and LLpgdA$^+$(E7) strains to survive at oxidative stress. For this, *L. lactis* strains were grown in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 2 or 4 mM (MERCK). After 1 h of incubation at 37°C, viability was measured by estimating bacterial populations using a spiral plater.

2.5. Animals and immunization protocol

C57BL/6 mice (females, 6–8 wk of age; Charles River Laboratories, France) were housed in a pathogen-free isolator under sterile conditions in the animal facilities of the Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif at the National Institute of Agricultural Research (Jouy-en-Josas, France). All experiments were performed according to protocols in accordance with institutional guidelines. Groups of 7 mice were used in each experiment.

For live bacteria inocula, *L. lactis* strains were grown as described above. To induce the expression of E7 antigen, fresh medium was inoculated 1:20 (vol/vol) with a overnight culture of each recombinant strain and grown until OD_{600}= ~0.6, followed by induction with 10 ng/ml nisin (Sigma) for 1 h as previously described (Bermúdez-Humarán *et al*., 2002). Cellular pellets were then harvested by centrifugation at 3000 x *g* at 4°C and washed three times with sterile phosphate buffered saline (PBS). The pellet was suspended in PBS to a final concentration of 5 x 10^9 CFU for intragastric immunization.

Immunizations were performed as follows: groups of mice were administered intragastrically for three consecutive days with 5 x 10^9 CFU of each recombinant strain suspended in 100 µl of PBS. This protocol was repeated twice at 2-week-intervals. Control mice received PBS.

2.6. Enumeration of viable L. lactis strains in feces and ileon

30, 60 and 90 min after intragastric administration with LL(E7), LLpgdA$^-$(E7) and LLpgdA$^+$(E7) strains, ileon content was collected by washing with 1 ml of sterile PBS supplemented with protease inhibitors (PBS-a, protease inhibitor cocktail tablets, Roche). Then, different dilutions were plated on selective medium (GM17 plus 2.5 µg/ml erythromycin and 40 g/ml nalidixic acid) and colonies counted. Feces samples were also analyzed after dilution (1/10) in PBS.

Thermoresistant *Bacillus subtilis* spores (MERCK) were used as transit markers and activated at 60°C in G-spore medium according to the classical method described for enumeration (Mater *et al*., 2005).

2.7. Analysis of immune response

Seven days after the last immunization (day 35), sera and gastrointestinal lavages (GAL) were collected. Blood samples were obtained from the retro-orbital venous plexus, centrifuged and sera stored at -80°C until further analysis. Mice were sacrificed by vertebral dislocation, spleen and GAL fluids were collected in sterile conditions. To recover GAL fluids, the entire gastrointestinal tract was removed and flushed with 1 ml of PBS. The

intestinal content obtained was vortexed vigorously for 1 min, and centrifuged at 5000 x g to eliminate debris. Finally, GAL fluids were recovered and stored at -80°C until further analyses.

The detection of IgG and IgA E7-specific antibodies was performed essentially as previously described (Cortes-Perez *et al*., 2007). Briefly, ninety-six-well microtiter plates (Nunc Maxisorp) were coated with 1 µg/ml of purified *E. coli*-derived E7 protein (Watterlot *et al*., unpublished data) in 200 µl of sodium carbonate buffer (50 mM sodium carbonate, 1 mM $MgCl_2$ pH 9.8) overnight at 4°C. Plates were washed twice with PBS-Tween (PBS containing 0.05% Tween) and wells blocked with 300 µl/well of blocking buffer (3% bovine serum albumin in PBS-Tween) for 1 h at room temperature. Plates were then washed with PBS-Tween and samples tested (diluted 1/100) in a volume of 100 µl of PBS containing 1% BSA. After 2 h of incubation at 20°C, the plates were washed and 100 µl of a secondary anti-mouse IgG or IgA antibodies (alkaline-phosphatase conjugated goat, Sigma-Aldrich, France) diluted 1/2000 in blocking buffer was added and the plate incubated 1h at 20°C. The plates were washed and the reaction developed by addition of 100 µl of HRP (Horse Radish Peroxydase) dissolved at 10 mg/ml in sodium carbonate buffer. The plates were incubated at room temperature until yellow color was developed (30-60 min). Finally, the reaction was stopped by the addition of 50 µl of 2 N H_2SO_4. The absorbance was immediately measured at 405 nm (A_{405nm}). The result obtained is formulated by end point titer.

To determine cytokine production in splenocytes, spleen cells were first separated on a Ficoll-Hypaque (Sigma) density gradient. A total of (1×10^6 cells/well) in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS were plated in a 24-well plate (2 ml per well), at 37°C under 5% CO_2. Cell suspensions were re-stimulated with 2 µg of a synthetic E7 peptide (RAHYNIVTF) to determine whether *in vitro* restimulation induced a peptide-specific cellular response. After 24 h, cell suspensions were filtered and supernatants were examined for the presence of IFN-γ, IL-5, IL-4 and IL-2 cytokines using mice ELISA according to the supplier specifications (eBioscience, San Diego, CA. USA). Serum and GAL samples were also assayed for the presence of the same of cytokines.

2.8. Statistical analyses

Student's method was used to compare the difference between groups and controls using JMP^{TM} statistic software. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Construction of L. lactis strains with various peptidoglycan deacetylation levels and producing E7 antigen

Our aim was to obtain a panel of *L. lactis* strains exhibiting variable resistance levels to lysozyme and to autolysis and producing HPV-16 E7 protein as model antigen (Bermúdez-Humarán *et al*., 2002). We thus express E7 in *L. lactis* strains with variable peptidoglycan de-*N*-acetylation levels.

First, we constructed a *pgdA*-negative mutant and a *pgdA*-overexpressing strain in *L. lactis* JIM7049, a strain carrying the *nisRK* genes integrated in its chromosome (Drouault *et al*., 2000) (Table 1). The *nisRK* genes are required for expression of a heterologous protein under the nisin-inducible promoter (NICE). In order to check that the constructed JIM7049 derivatives possessed various levels of peptidoglycan de-N-acetylation, their peptidoglycan structures were investigated by analysis of the muropeptide content. Peptidoglycan was extracted, digested with mutanolysin and the resulting muropeptides were separated by HPLC. As previously observed (Meyrand *et al*., 2007), we confirmed that the *pgdA* negative mutant (LLpgdA$^-$) lacks de-*N*-acetylated muropeptides in its PG whereas the de-*N*-acetylation level was increased in the overexpressing strain (LLpgdA$^+$) compared to the control strain JIM7049 carrying pJIM2279 empty plasmid (LL) (data not shown). The same strains were then tested for their resistance to lysozyme. They were plated on M17 glucose agar plates containing different concentrations of lysozyme (between 0 and 3 mg/ml). The results were similar to the one described previously for *L. lactis* IL6288. The control strain LL was resistant to 1 mg/ml lysozyme whereas the *pgdA* negative mutant LLpgdA$^-$ was sensitive to 1 mg/ml. In contrast, the overexpressing strain LLpgdA$^+$ with higher degree of peptidoglycan deacetylation showed increased resistance to lysozyme and growth in the presence of 2 mg/ml lysozyme while the control strain failed.

The strains LLpgdA$^-$, LLpgdA$^+$ and control strain LL were then transformed with pCYT:E7 plasmid, designed for intracellular production of the E7 antigen under NICE system (Bermúdez-Humarán *et al*., 2002). The lysozyme resistance of the pCYT:E7 transformed strains was similar to the one of the initial strains before transformation (data not shown). Intracellular E7 production was also confirmed by Western blot analysis in the three strains and no significant difference in protein levels were observed (Fig. 1).

3.2. Gastrointestinal persistence of recombinant strains

In order to test whether either the *in vitro* lysozyme-resistant and lysozyme-sensitive phenotypes may have a role in the persistence of *L. lactis* in the GIT, mice were intragastrically administered with these different strains and GIT persistence was monitored by enumeration of viable bacteria in the ileum after 30, 60 and 90 min. The results reveal a loss of 0.5 log (CFU) between 30 and 60 min after lactococci administration and a loss of 2 log (CFU) between 60 and 90 min for LL(E7), 3 log (CFU) for LLpgdA$^-$(E7) and 4.5 log (CFU) for LLpgdA$^+$(E7) (Fig. 2). These results did not show significant difference on the ability to resist to the GIT transit *in vivo* between our strains. Similar results were observed in the analysis of GIT persistence in feces (data not show). Altogether, these results suggest that LL(E7), LLpgdA$^-$(E7) and LLpgdA$^+$(E7) strains display the same behavior *in vivo*: they do not survive passage through the GIT. In addition, the ability of the different strains to resist or not to lysozyme *in vitro* does not confer the ability to resist the GIT transit *in vivo*.

3.3. Stress resistance of recombinant strains

Since lysozyme does not seem to mimic the GIT conditions, we then evaluated tolerance of the recombinant strains to bile salts and oxidative stress (see material and methods). As shown in Fig. 3, the survival of all recombinant strains in the presence of either bile salts or H_2O_2 is affected at the same levels, with a significant reduction at 0.1% of bile salts (Fig. 3A) and 4 mM of H_2O_2 (Fig. 3B). In conclusion, lysozyme-resistant and lysozyme-sensitive *L. lactis* strains does not resist better than wild-type strain to other stresses.

3.4. Evaluation of the antigen-specific immune response in mice after intragastric administration of recombinant strains producing E7 antigen

To evaluate the incidence of bacterial lysis on the host immune response, intragastric administrations in mice of LL(E7), LLpgdA$^-$(E7) and LLpgdA$^+$(E7) strains and analysis of the antigen-specific humoral and cellular immune responses were performed. To analyze the humoral immune response, E7-specific antibody production in gastrointestinal lavage (GAL) and serum samples were measured. As shown on Fig. 4A, the administration of recombinant LL(E7) strain led to a significant increase anti-E7 IgA GAL samples ($P< 0.05$) compared to LLpgdA$^-$(E7) strain. Interestingly, mice administered with LLpgdA$^+$(E7) strain seem to develop a higher anti-E7 IgA response when compared with the control PBS group and LLpgdaA$^-$(E7) strain, no significant difference could be established because of high individual variability (Fig. 4A). For IgG levels, only the LLpgdA$^-$(E7) strain led to significant anti-E7 antibodies in serum samples in comparison with the control group ($P< 0.05$) (Fig. 4B). In the animals administered with LL(E7) and LLpgdA$^+$(E7) strains, we observed a clearly anti-E7 IgG response but without reaching significant differences. We can conclude, that administration of lactococci induce more IgG levels than PBS group but individual variability does not permit to reveal a correlation between resistance to lysozyme *in vitro* and the ability to induce IgG and IgA production.

After the evaluation of the incidence of bacterial lyses in the humoral immune response, we then analyzed the antigen-specific cellular response. We thus measured the secretion of IFN-γ , IL-5, IL-4 and IL-2 cytokines in GAL and serum samples as well as in re-stimulated splenocytes. As shown in Fig. 5A, mice treated with LL(E7) produce higher levels of IFN-γ in GAL samples than other groups (PBS, LLpgdA$^+$(E7) and LLpgdA$^-$(E7)). In serum samples and re-stimulated splenocytes, we did not observe significant differences in IFN-γ production level between all groups (Fig. 5B and data not shown). For all other cytokines, we observed essentially the same production level as the one observed for IFN-γ (data not shown).

Altogether, these results suggest that in the range tested, the *in vitro* lysozyme resistance level and thus the modification of peptidoglycan in *L. lactis* have no impact on the ability of *L. lactis* to deliver E7 antigen *in vivo.*

3.5. Discussion

We previously showed that *L. lactis* producing E7 antigen induce a lower immune response than either a *L. lactis* secreting E7 protein or anchoring at its cell surface (Bermúdez-Humarán *et al*., 2004). In this study, we evaluated if the capacity of *L. lactis* to resist longer in GIT has an impact on its ability to deliver an antigen *in vivo* (*eg.* E7 protein) and to enhance the antigen-specific immune response. Therefore, we constructed three *L. lactis* strains with different levels of PG deacetylation and producing an intracellular form of the HPV-16 E7 protein. Thereby, these three *L. lactis* strains have different resistance to lysozyme and express similar amounts of E7. We first characterized the recombinant strains *in vitro* and *in vivo* and our results showed that, the ability of the different strains to resist or not to lysozyme *in vitro* does not confer any resistance in the GIT (*in vivo*). We also demonstrated the capacity of the different strains to resist to other stress, such as bile salts or oxidative stress *in vitro*. We try to mimic GIT conditions with 0.5% of bile salts, however, *L. lactis* strains do not resist to this concentration, then we used 0.1% of bile salts and 4mM to H_2O_2 (Vizoso Pinto *et al*., 2005). At these conditions, we observed an effect on growth but no correlation could be established between their capacity to resist to lysozyme and their capacity to growth with either oxidative or bile salts stress *in vitro*. We then analyzed the immune response evoked by the different *L. lactis* strains. The results suggest that *in vitro* lysozyme resistance level and the modification of peptidoglycan in *L. lactis* have no impact on the ability of *L. lactis* to deliver E7 antigen *in vivo*. Lysozyme is constitutively express in the upper GIT: it is found in Brunner's gland in the duodenum and in paneth's cell in the small intestine. However, little is known about the regulation of lysozyme expression and function in the GIT (Dommett *et al*., 2005). Lysozyme represents about 2.5% of total protein synthesized by macrophages (Gordon *et al*., 1974). The level of resistance to lysozyme *in vitro* is limited to 2 mg/ml for LLpgdA+, it is thus probable that this concentration does not mimic GIT conditions and *L. lactis* strains lyse *in vivo*. The lack of an adequately immune response could be explained by the fact that E7 is an extremely labile protein and it is quickly degraded into the cytoplasm in *L. lactis* before evoke an immune response (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002, 2003). Finally, innate host response can also play an important role in bacterial lysis by antimicrobial peptides, mucines and defensins secreted in GIT which could explain the inability of our recombinant strain to resist *in vivo*.

To conclude, these results suggest that LL(E7), LLpgdA$^-$(E7) and LLpgdA$^+$(E7) strains display the same behaviour *in vivo*: they do not survive passage through the GIT, the *in*

vitro lysozyme resistance level and thus the modification of peptidoglycan in *L. lactis* have no impact on the ability of *L. lactis* to deliver E7 antigen *in vivo.*

ACKNOWLEDGEMENTS

L. Watterlot was recipient of a grant from the department of Food Chain Microbiology (MICA, INRA, France). We are grateful to Marielle Bouix, Naima Cortes-Perez and Claire Cherbuy for their precious help in the preparation of this manuscript.

REFERENCES

Bermúdez-Humarán, LG., Langella, P., Miyoshi, A., Gruss, A., Guerra, RT., Montes de Oca-Luna, R., Le Loir, Y., 2002. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. Applied Environmental Microbiology 68, 917-22.

Bermúdez-Humarán, LG., Cortes-Perez, NG., Le Loir, Y., Gruss, A., Rodriguez-Padilla, C., Saucedo-Cardenas, O., Langella, P., Montes de Oca-Luna, R., 2003. Fusion to a carrier protein and a synthetic propeptide enhances E7 HPV-16 production and secretion in *Lactococcus lactis*. Biotechnology Progress 19, 1101-04.

Bermúdez-Humarán, L. G., Cortes-Perez, N. G., Le Loir, Y., Alcocer-Gonzalez, J. M., Tamez-Guerra, R. S., Montes de Oca-Luna, R., Langella, P., 2004. An inducible surface presentation system improves cellular immunity against E7 antigen after nasal administration with recombinant *lactococci*. Journal of Medical Microbiology 53, 1–7.

Bermúdez-Humarán, LG., 2009. *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. Human Vaccines 5, 4.

Chopin, A., Chopin, MC., Moillo-Batt, A., Langella, P., 1984. Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. Plasmid 11, 260-263.

Cortes-Perez, NG., Lefèvre, F., Corthier, G., Adel-Patient, K., Langella, P., Bermúdez-Humarán, LG., 2007. Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. Vaccine 25, 6581-8.

Dommett, R., Zilbauer, M., George, JT., Bajaj-Elliott, M., 2005. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. Molecular Microbiology 42, 903-12.

Drouault, S., Corthier, G., Ehlrich, D., Renault, R., 2000. Expression of the *Staphylococcus hyicus* Lipase in *Lactococcus lactis.* Applied and environmental microbiology 66, 588-598.

Fernandez, A., Horn, N., Wegmann, U., Nicoletti, C., Gasson, MJ., Narbad, A., 2009. Enhanced secretion of biologically active murine interleukin-12 by *Lactococcus lactis*. Applied Environmental Microbiology 75, 869-71.

Guédon, E., Serror, P., Ehrlich, SD., Renault, P., Delorme, C., 2001. Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. Molecular Microbiology 40, 1227-1239.

Gordon, S., Todd, J., Cohn, ZA., 1974. In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. The Journal of Experimental Medecine 139, 1228-48.

Grangette, C., Müller-Alouf, H., Hols, P., Goudercourt, D., Delcour, J., Turneer, M., Mercenier, A., 2004. Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. Infection and Immunity 72, 2731-7.

Gruzza, M., Duval-Iflah, Y., Ducluzeau, R., 1992. Colonization of the digestive tract of germ-free mice by genetically engineered strains of *Lactococcus lactis*: study of recombinant DNA stability. Microbiology Releases 1, 165–71.

Hanniffy, S., Wiedermann, U., Repa, A., Mercenier, A., Daniel, C., Fioramonti, J., Tlaskolova, H., Kozakova, H., Israelsen, H., Madsen, S., Vrang, A., Hols, P., Delcour, J., Bron, P., Kleerebezem, M., Wells, J., 2007. Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. Advances in Applied Microbiology 56, 1-64.

Langella, P., Le Loir, Y., Ehrlich, S. D., Gruss, A., 1993. Efficient plasmid mobilization by pIP501 in *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Journal of Bacteriology 175, 5806–5813.

Lee P, Abdul-Wahid., A, Faubert GM., 2009. Comparison of the local immune response against Giardia lamblia cyst wall protein 2 induced by recombinant *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii*. Microbes Infections 11, 20-8.

Mater, DD., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, MJ., Mogenet, A., Bresson, JL., Corthier, G., 2005. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 250, 185-7.

Medaglini, D., Ciabattini, A., Spinosa, MR., Maggi, T., Marcotte, H., Oggioni, MR., Pozzi, G., 2001. Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice. Vaccine 19, 1931–9.

Meyrand, M., Boughammoura, A., Courtin, P., Mézange, C., Guillot, A., Chapot-Chartier, MP., 2007. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in *Lactococcus lactis*. Microbiology 153, 3275-85.

Renault, P., Corthier, G., Goupil, N., Delorme, C., Ehrlich, SD., 1996. Plasmid vectors for gram-positive bacteria switching from high to low copy number. Gene 183, 1227-1239.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, M; Remaut, E., Le Page, R., W. F, Wells J. M., 1998. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. Infection and Immunity 66, 3183–3189.

Vesa, T., Pochart, P., Marteau, P., 2000. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. Alimentary Pharmacology and Therapeutics 14, 823–8.

Vizoso Pinto, MG., Franz, CM., Schillinger, U., Holzapfel, WH., 2005. *Lactobacillus spp.* with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. International Journal of Food Microbiology 109, 205-14.

TABLES LEGENDS

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains and plasmids	Relevant genotype or phenotype	Source or reference
L. lactis subsp. lactis		
IL1403	Plasmid-free strain	Chopin et al., 1984
JIM7049	IL1403 derivative with *nis*RK genes integrated into chromosome.	Drouault et al., 2000
LL pgdA$^-$	Em^r, JIM7049 derivative, *pgdA* mutant obtained by SCO integration of pJIM2242 plasmid containing a 597-bp *pgdA* internal fragment.	This study
LL pgdA$^-$ (E7)	Em^r, Cm^r, pgdA - containing pCYT E7 plasmid carrying *E7* gene under the control of promoter nisA.	This study
LL pgdA$^+$	Em^r, JIM7049 derivative containing pJIM2279 plasmid carrying *pgdA* gene under the control of its own promoter.	This study
LL pgdA$^+$ (E7)	Em^r, Cm^r pgdA + containing pCYT E7 plasmid.	This study
LL	Em^r, JIM7049 derivative containing pJIM2279 empty.	This study
LL (E7)	Em^r, Cm^r containing pJIM2279 empty and pCYT E7 plasmid.	This study
Plasmids		
pJIM2242	Em^r, derivative of pORI28 non replicative vector in *L. lactis*.	Guedon et al., 2001
pJIM2279	Em^r, derivative of pILnew.	Renaud et al., 1996
pCYT:E7	Cm^r, derivative of pGK12.	Bermudez *et al*., 2002

FIGURES LEGENDS

Fig. 1. Western blot analysis of recombinant *L. lactis* E7 producing strains. Production of E7 protein in recombinant *L. lactis* strains LL(E7), LLpgdA$^-$(E7) and LLpgdA$^+$(E7) were analyze by western blot of whole cell extracts.

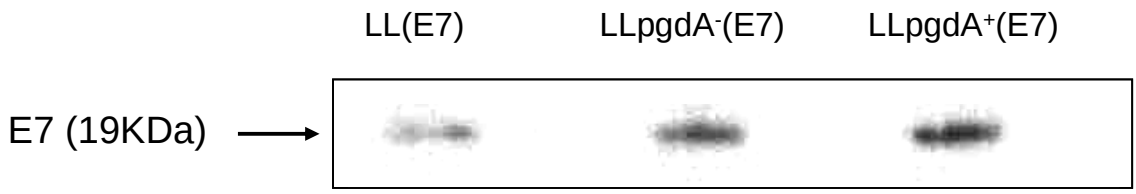


Fig. 2. Gastrointestinal persistence of recombinant *L. lactis* strains. Comparative time of survival of LL(E7), LLpgdA$^-$(E7) and LLpgdA$^+$(E7) were measured in the contents of ileon after 30, 60 and 90 min following intragastric gavages.

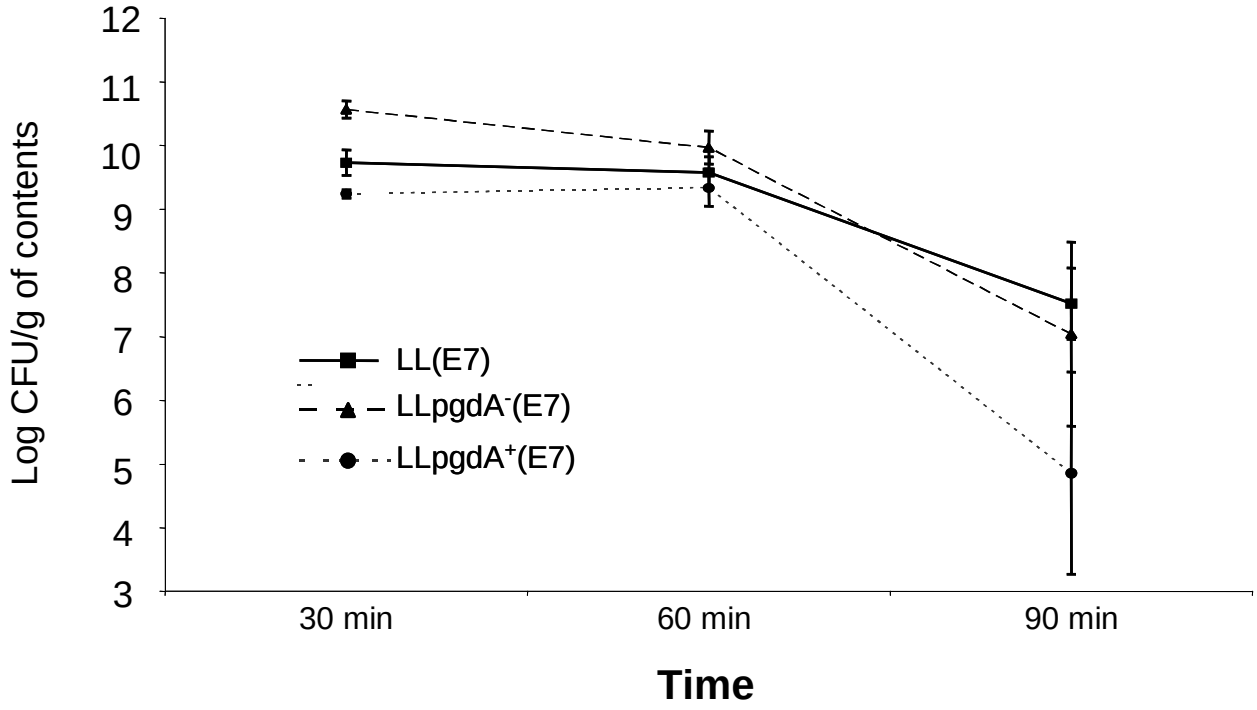


Fig. 3. Stress resistance of recombinant *L. lactis* strains. Test of the sensitivity to bile salt stress (A) and oxidative stress (B) depending of the differents strains LL(E7), LLpgdA$^-$(E7) and pgdA$^+$(E7). Bile salt or H_2O_2 are included at different concentrations inside the growth medium bacteria. The shocks were 3h at 37°C and 1h at 30°C for bile salts and oxidative stress, respectively. Then, we counted colonies forming unit of resistant bacteria. After incubation (1h at 37°C with bile salts or 1h at 30°C for oxidative stress), viability was measured by plating.

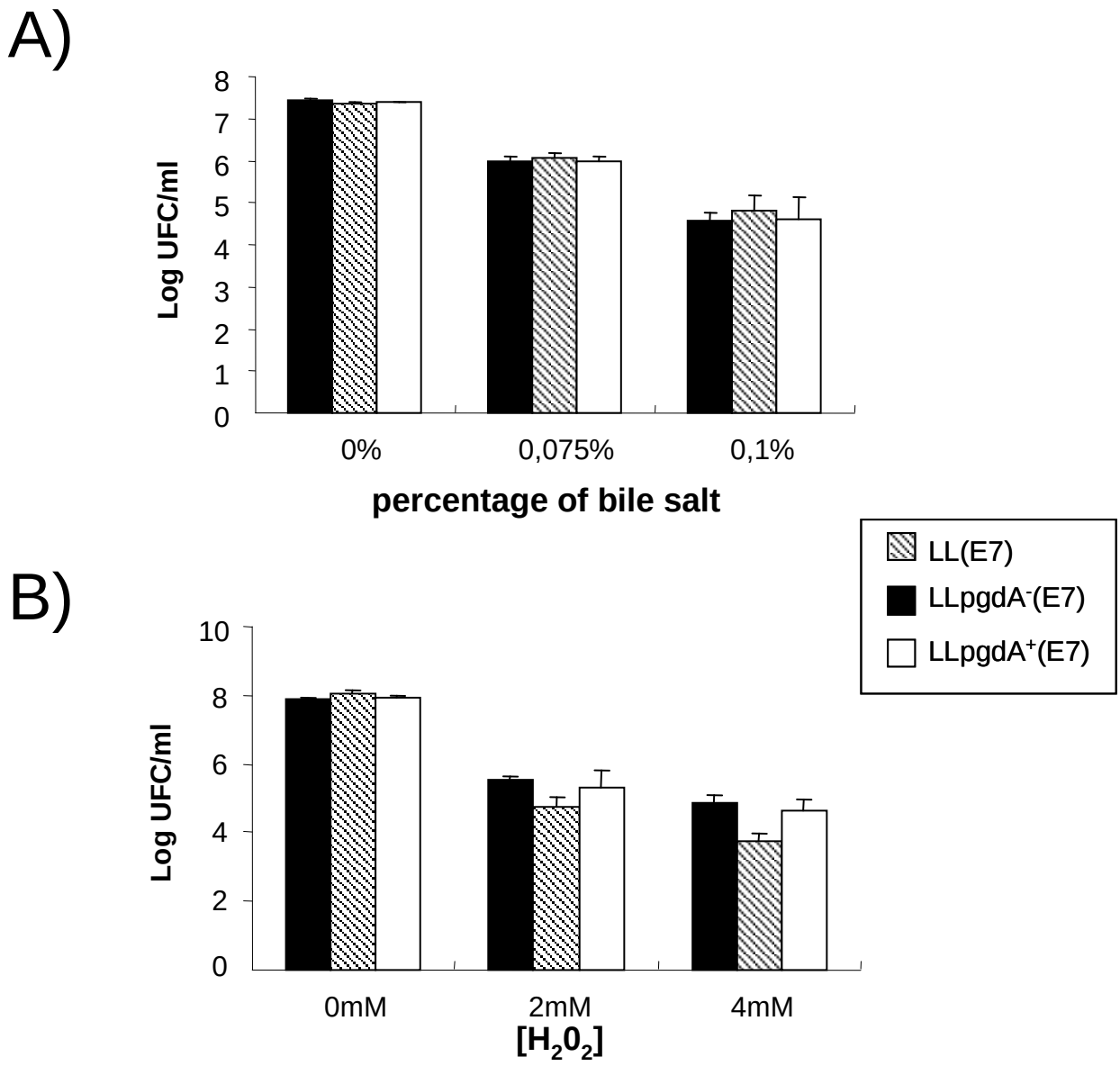


Fig. 4. Analysis of the immune response anti-E7 IgA (A) an anti-E7 IgG (B). Analysis of the immune response were evaluate 35 days after oral immunization with $1*10^9$ recombinant LLpgdA$^-$(E7), LLpgdA$^+$(E7), LL(E7) and PBS. Individual samples from A) gastrointestinal wash and B) sera of two groups of seven mice C57 BL/6 immunized orally were tested by ELISA for specific IgA and IgG. Statistically significant differences (Student's test, $p<0.05$) are denoted by an asterisk (*).

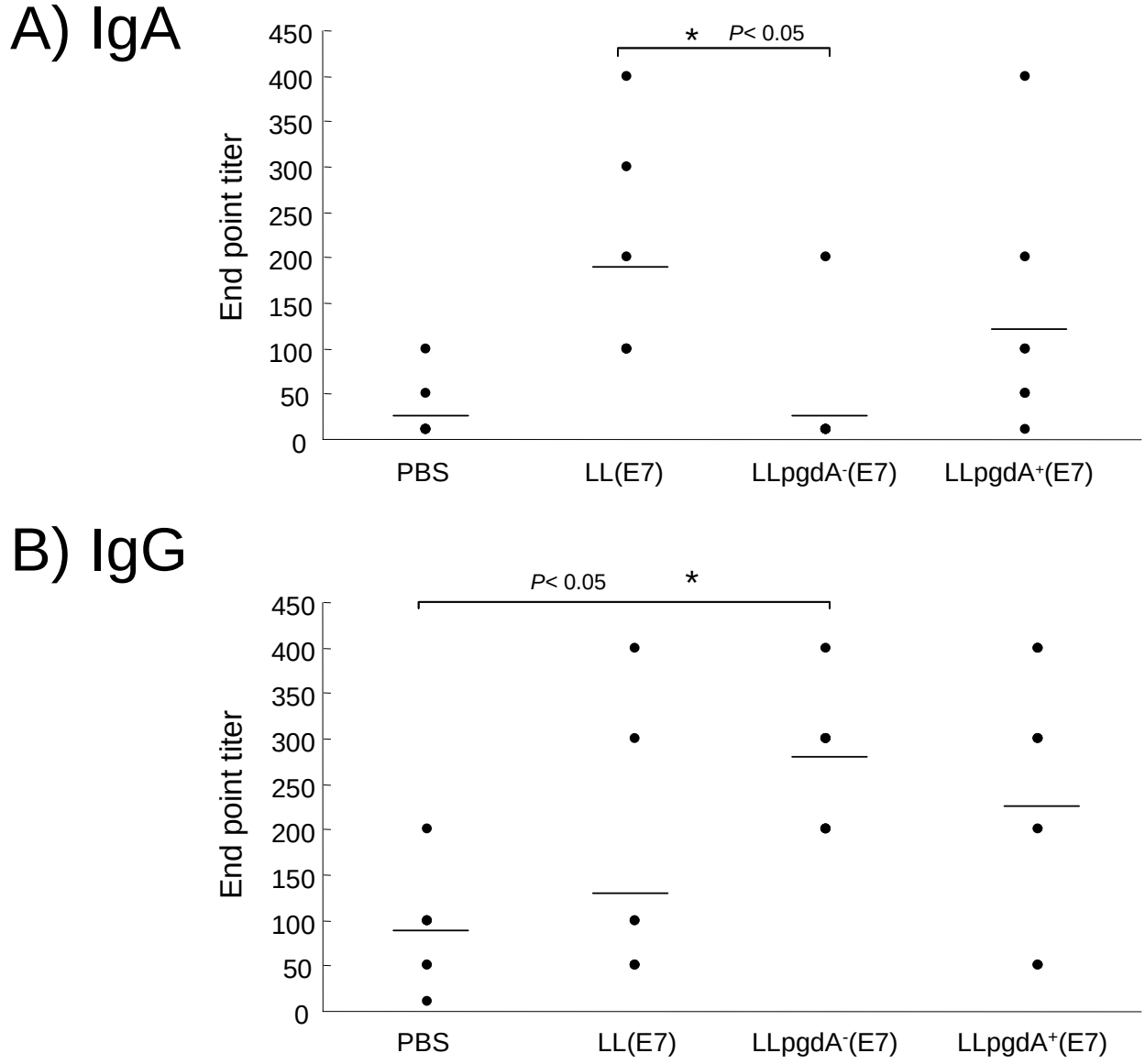
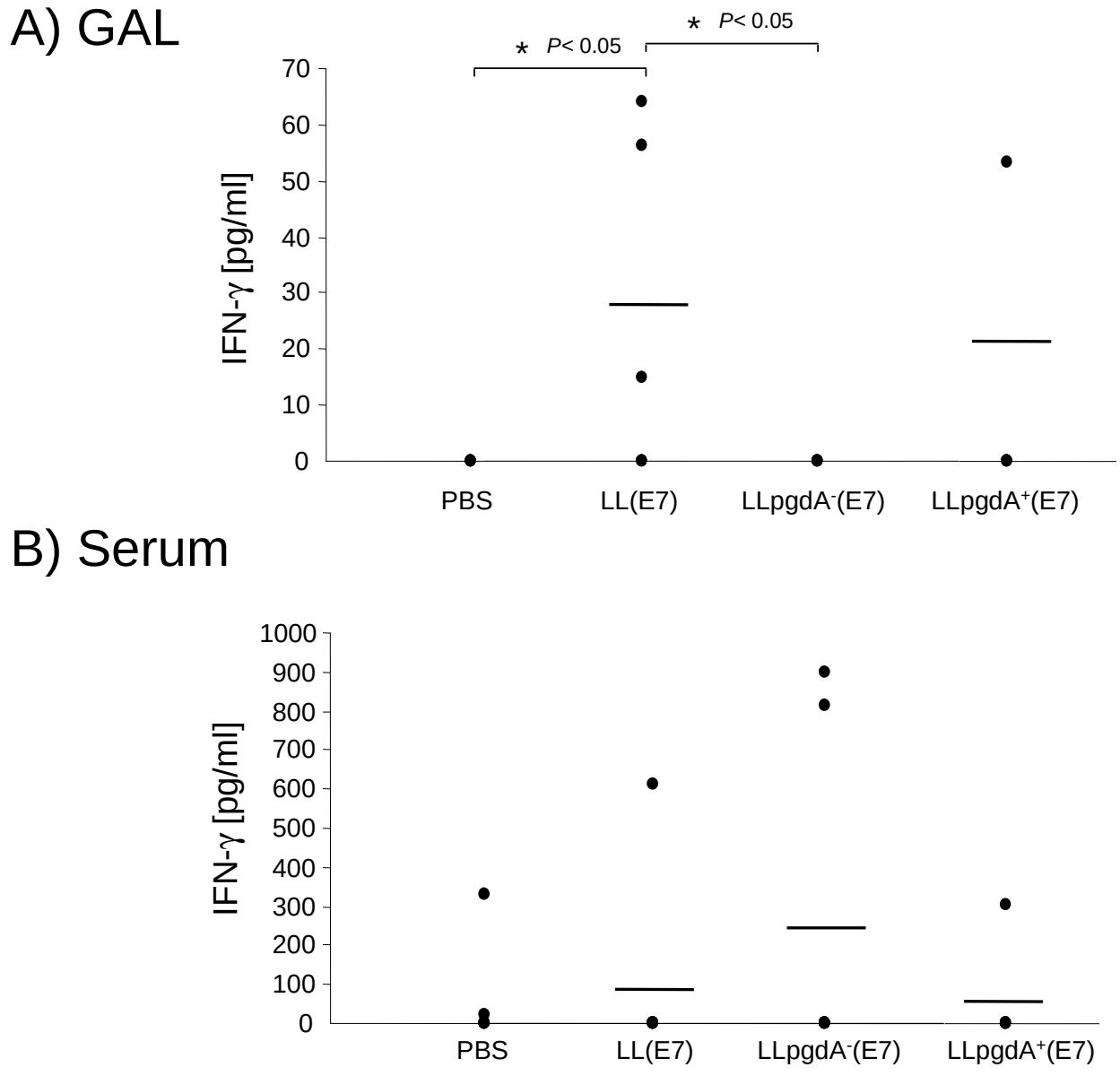


Fig. 5. Analysis of the IFN-γ response. Analysis of production IFN-γ were evaluate 35 days after oral immunization with $1X10^9$ recombinant LLpgdA$^-$(E7), LLpgdA$^+$(E7), LL(E7) and PBS. Individual sample from A) gastrointestinal wash B) and sera of two experiments of seven mice C57 BL/6 by group, immunized orally were tested by ELISA for specific IFN-gamma. Statistically significant differences (Student's test, $p<0.05$) are denoted by an asterisk (*).



3) Les lactobacilles et les bifidobactéries peuvent-elles constituer des vecteurs efficaces pour délivrer des protéines d'intérêt santé ?

- **Contexte de l'étude**

Comme nous l'avons vu précédemment, certaines souches de bifidobactéries et lactobacilles sont considérées comme probiotiques : elles participent à la stimulation du système immunitaire et leur transit dans notre TD dure environ 10 jours pour les bifidobactéries et 4 jours pour les lactobacilles, ce qui en fait des candidats vecteurs attractifs pour délivrer des molécules d'intérêt santé (Schell *et al*., 2002; O'Mahony *et al*., 2005; Sheehan *et al*., 2007). Dans de précédents travaux, nous avons démontré que l'administration de *Lb. plantarum* exprimant l'Ag E7 permettait d'augmenter la réponse immnunitaire en comparaison avec un lactocoque sécrétant le même Ag (Cortes-Perez *et al.*, 2007). Dans cette étude, nous avons voulu comparer l'efficacité de ces deux vecteurs (bifidobactéries et lactobacilles) à stimuler la réponse immunitaire anti-E7.

- **Objectifs et stratégies**

Nous avons développé durant ma première année de thèse de nombreux outils de biologie moléculaire spécifiques pour les bifidobactéries, nous avons également construit des vecteurs de production de protéines hétérologues fonctionnelles chez les bifidobactéries et les lactobacilles. Ces vecteurs possèdent un promoteur inductible aux sels biliaires permettant d'activer la transcription du gène d'intérêt lors du passage dans l'intestin obtenant ainsi une action ciblée de la protéine d'intérêt. Après la mise au point des méthodes de biochimie telles que l'extraction des protéines et le Western blot, nous avons construit et analysé l'expression de l'Ag E7 par *B. infantis* et *Lb. plantarum* sous le contrôle des promoteurs inductibles *in situ*. Nous avons alors testé nos mutants *via* l'analyse de la réponse immunitaire anti-E7 dans le modèle murin.

- **Résultats**

Les résultats sont présentés dans l'article « Bifidobacteria as a new vector for mucosal delivery of therapeutic proteins » p°120.

- **Conclusions et perspectives**

La mise au point des outils génétiques chez les bifidobactéries nous a permis d'obtenir des mutants capables de produire une protéine hétérologue telle que la nucléase ou l'Ag E7 de l'HPV-16, mais nous n'avons pas pu observer leurs sécrétions. Il est probable que l'absence de sécrétion provienne de la faible efficacité du PS utilisé d'origine *L. lactis*. Afin de remédier à ce problème, nous avons tenté, en vain, de cloner un PS d'origine *B. longum* (BL1181), son haut pourcentage en base GC semble être toxique pour les bactéries autres que *Bifidobacterium* rendant le clonage extrêmement complexe. Nous avons tout de même choisi d'analyser la réponse immunitaire spécifique envers l'Ag E7 induite *in vivo*. Nos travaux ont ainsi démontré le potentiel des bifidobactéries en tant que vecteur de protéines d'intérêt santé. La comparaison effectuée entre les vecteurs *Lb. plantarum* et *B. infantis* produisant le même Ag sous le contrôle de promoteurs inductibles aux sels biliaires a démontré que le genre *Bifidobacterium* permettait d'induire une réponse immunitaire supérieure à celle induite par le genre *Lactobacillus*. Ces résultats démontrent combien le choix du vecteur est un critère essentiel dans l'utilisation des BLGM et que l'adaptation des bactéries au sein du TD est un facteur essentiel dans ce choix.

Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives concernant l'utilisation de *Bifidobacterium* en tant que BLGM. Son potentiel de vectorisation associé à ses capacités intrinsèques anti-inflammatoires et son statut alimentaire font de ce genre, un candidat potentiel idéal pour vectoriser et délivrer des protéines anti-inflammatoires au sein même du TD et traiter ainsi les MICI. Enfin, dans les perspectives de mon travail de thèse, j'ai récemment initié une étude portant sur la comparaison des capacités d'immunisation des bifidobactéries et des lactobacilles produisant l'antigène E7 dans la prévention du développement de tumeurs induites par l'administration sous-cutanée de cellules tumorales TC-1 à des modèles murins.

Mes travaux concernant l'étude du genre Bifidobacterium seront valorisés dans l'article suivant auquel se rajouteront les résultats des expériences en cours et feront ainsi l'objet d'une soumission probable au journal « Journal of Immunology ».

- **Article : Bifidobacteria as a new vector for mucosal delivery of therapeutic proteins**

BIFIDOBACTERIA AS A NEW VECTOR FOR MUCOSAL DELIVERY OF THERAPEUTIC PROTEINS

Laurie Watterlot, Naima G. Cortes-Perez, Claire Cherbuy, Sébastien Blugeon, Jean-Jacques Gratadoux, Chantal Bridonneau, Gérard Corthier, Philippe Langella and Luis G. Bermúdez-Humarán*

[1]Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif, and [2]Unité de Virologie et Immunologie Moléculaire, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France.

*Corresponding author : Dr. Luis G. Bermúdez-Humarán: Institut MICALIS (Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé humaine) UMR INRA-AgroParisTech n°1319, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France. E-mail: luis.bermudez@jouy.inra.fr. Phone: +33-134-65-24-63 Fax: +33-134-65-24-62.

Key words: Lactic acid bacteria, *Bifidobacterium infantis, Lactobacillus plantarum, Lactococcus lactis*, immune response, HPV-16, E7.

ABSTRACT

Mucosal immunity plays a major role in the prevention of infectious diseases. Genetically engineered lactic acid bacteria (LAB) have been successfully tested in the last ten years as safe mucosal delivery vectors. Previous studies have shown that the intrinsic immunomodulatory properties of a LAB, *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*), and its persistence (2-3 days) in the mice gastrointestinal tract (GIT) play an important role in the immunogenicity of the delivered antigen. In this work, we compared the potential of a recombinant strain of *Bifidobacterium infantis* (*B. infantis*) (a LAB strain able to persist up to 10 days in the GIT) producing E7 antigen to that of its counterpart *Lb. plantarum* producing the same antigen to evoke an E7-specific immune response in mice after intragastric administration. Our results revealed a higher antigen-specific systemic and mucosal immune response after intragastric administration of *B. infantis* producing E7. Altogether, these results demonstrate the advantages of bifidobacteria strains as a new antigen delivery vector.

1. INTRODUCTION

The use of bacteria as live vector for delivery of therapeutic proteins seems an effective strategy for topical delivery of immunomodulatory proteins because it circumvents systemic side effects and allows long-term treatment of chronic diseases. In particular, LAB represents an original and attractive approach, as they are safe organisms that are used as food starters and probiotics. The non-colonizing gram-positive bacterium *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) has been largely used to deliver therapeutic proteins to the mucosal tissues (Steidler *et al*., 2000; Bermudez-Humaran, 2004) Some *Lactobacillus* spp. strains, which are able to persist in the intestinal tract for several days after administration, have been also used to deliver proteins and shown to be more immunogenic than lactococci strains (Cortes-Perez *et al*., 2007). This suggests that intrinsic immunomodulatory properties and longer persistence in the GIT of *Lactobacillus* spp. make this genus a better delivery vector than lactococci.

In this context, Bifidobacteria (some species are able to persist up to 10 days in the GIT after administration), may be particularly interesting for the mucosal delivery of therapeutic proteins. *Bifidobacterium* spp. are Gram-positive anaerobic bacteria which have numerous characteristics that make them interesting vector for heterologous protein production: i) they are non-pathogenic predominant members of intestinal microbiota that

play important role in health promoting properties (Van Der Werf, 2001; Kerckhoffs *et al*., 2009), ii) they are of increasing commercial interest due to their widespread use in the growing probiotics industry and, iii) they can selectively colonize and grow on the hypoxic region of solid tumors after intravenous injection (Nakamura *et al*., 2002; Fujimori, 2006), an advantage when used as delivery vector for cancer therapy. Altogether, these observations suggest the potential of *Bifidobacterium* spp. as a new vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. However, despite all these advantages, no commercial expression vectors are available for the expression of heterologous proteins using these bacteria.

In this work, we describe the construction of an inducible expression vector for Bifidobacteria that allow a controlled-targeted protein production: pBifSEC:Nuc. This system is based on Nuc as a reporter protein, which allows a rapid and direct screening of the recombinant clones based on the Nuc activity test on Petri plates (Shortle, 1983), the signal peptide (SP) of Exp4 protein (SPExp4, the predominant *L. lactis*-secreted protein) (Poquet *et al*., 1998), the broad host range plasmid pWV01 (Kok *et al*., 1984) and a stress bile salt-inducible promoter. In addition, this plasmid incorporates a unique *Nsi*I restriction site convenient to replace *nuc* gene by a gene encoding a heterologous protein of interest (Bermudez-Humaran *et al*., 2003a). This system was then used to produce a protein of medical interest, the human papillomavirus type-16 (HPV-16) E7 antigen. HPV-16 is the most common sexually transmitted infection and responsible for 90-99 % of cervical cancer cases (second cause of cancer-related deaths in women worldwide) (zur Hausen, 1991). Production of E7 by recombinant *B. infantis* was confirmed by western blot experiments. We then analyzed and compared the immune response evoked by the intragastric administration of recombinant *B. infantis* to that of its counterpart *Lb. plantarum* producing the same protein. Our results revealed a higher E7-specific systemic (i.e. CD4+ and CD+ T cell proliferation) and mucosal immune response (*ie*. IFN-γ and IL-5 secretion and humoral antibodies production) after intragastric administration of *B. infantis* producing E7 antigen. Altogether, these results demonstrate the advantages of bifidobacteria strains as a new antigen delivery vector.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacterial strains, plasmids and DNA manipulation. The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1 and Table 2, respectively. *L. lactis* was grown in M17

medium (Difco Laboratories, England) supplemented with 1% glucose at 30°C without agitation. *Escherichia coli* (*E. coli*) was grown in Luria-Bertani medium (LB; Difco Laboratories, England) at 37°C with vigorous shaking. *B. infantis* was grown in MRS medium (Difco Laboratories, England) supplemented with 0.5mg/ml cystein (Sigma) (MRS-C) at 37°C in anaerobic condition without shaking. *Lb. plantarum* was grown in MRS medium (Difco Laboratories, England) at 37°C in aerobic condition without shaking. Recombinant bacteria were selected by addition of chloramphenicol antibiotic as follows: 10 µg/ml for *L. lactis* and *E. coli*, 5 µg/ml for *Lb. plantarum* and 2 µg/ml for *B. infantis.*

Plasmid DNA isolation and general procedures for DNA manipulations were essentially performed as described previously (Sambrook *et al*., 1989). PCR amplification was performed was performed using High Fidelity Vent DNA polymerase (Promega) with a thermal cycler (applied biosystem). DNA sequences were confirmed by sequencing (MWG-Genomic Company, Germany).

2.2 Construction of an inducible expression vector for Bifidobacteria. In order to construct the plasmid which allows a controlled-targeted heterologous protein production in *Bifidobacterium*. spp. we cloned *dnaK* promoter from *B. longum* 89/11 strain in pSEC:Nuc vector, a plasmid previously used to secrete Nuc protein in *L. lactis* (Table 2) (Morello *et al*., 2008). Briefly, a 241 bp DNA fragment containing *dnaK* promoter was PCR amplified from genomic DNA with primers: *Bgl*II-PdnaK-Bif (5'-CCA***AGATCT***CAAAAAACB TGAGCCWAMMWYRCTCAACTT-3') for the coding strand and *Nhe*I-PdnaK-Bif (5'-A***GCTAGC***GTTAATAAAGCAAGGTTTATTTTTTTCATAACGTGTGCTCCTTAATTAY TCGTTTGTTCTTACGTTSTTYG-3'). The PCR product was subcloned into a pCR-TOPO kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) resulting in pCR-TOPO:dnaK-Bif (Table 2). Afterwards, the DNA fragment containing *dnaK* promoter was obtained from pCR-TOPO:dnaK-Bif with *Bgl*II/*Nhe*I enzymes (New England) and cloned into purified backbone isolated from *Bgl*II/*Nhe*I-cut pSEC:Nuc vector, resulting in pBifSEC:Nuc (Fig. 1A, Table 2). This vector was established into *B. infantis* strain.

2.3 Site-specific mutagenesis. Nucleotide sequence analysis of pBifSEC:Nuc vector revealed a deletion in the SP_{Exp4} (data not shown). To repair this, we performed directed mutagenesis by PCR. Briefly, we established first pBifSEC:Nuc vector in *E. coli* TG1 strain in order to purify large quantities of the plasmid, we then performed a first PCR reaction with forward primer: 5'-GTTATGAAAAAAATAAACCTTGCTTTATTAACGCTA-3' using *Pfu* turbo

DNA polymerase (Promega). Parameters of PCR were : a first cycle at 95°C 1 min and 5 cycles at 95°C 30s/55°C 1 min/68°C 4 min. Afterwards, we performed a second PCR reaction on first PCR product with forward and reverse primer: 5'-TAGCGTTAATAAAGCAA GGTTTATTTTTTTCATAAC-3'). Parameter of PCR were (first cycle: 95°C, 1min; 20 cycles: 95°C 30s / 55°C 1min / 68°C 4min; 4°C). Then we effected one digestion with *DpnI* enzyme (New England) before transformed into *L. lactis* MG1363. Construct of pBifSEC:Nuc was then checked by sequencing.

2.4 Construction of the inducible expression vector of HPV-16 E7 antigen in Bifidobacteria. For the production of E7 antigen, the DNA fragment encoding Nuc from pBifSEC:Nuc plasmid was replaced by E7 gene. For this, a DNA fragment encoding E7 was obtained from pSEC:E7 plasmid (Table 2) (Bermudez-Humaran *et al*., 2002) with *Nsi*I/*Eco*RI (New England) and cloned into pBifSEC:Nuc vector digested with the same enzymes and replacing the corresponding DNA fragment of Nuc. The resulting plasmid pBifSEC:E7 (Fig. 1B, Table 2) was established into *B. infantis* strain.

2.5 Construction of an inducible expression vector for *Lactobacillus spp*. In order to construct the plasmid which allows a controlled-targeted heterologous protein production in *Lactobacillus* spp. we cloned promoter of lp_0775, a putative stress-induced protein from *Lb. plantarum* NCIMB8826 strain, in pSEC:Nuc vector. Briefly, a 388 bp DNA fragment containing *lp_0775* promoter was PCR amplified from genomic DNA with primers: *Bgl*II-Plp_0775 (5'-CCA***AGATCT***AGTAGACCAAAATATAAAAAGTAATGGTG-3') for the coding strand and *Nhe*I-Plp_0775 (5'-A***GCTAGC***GTTAATAAAGCAAGGTTTATTTTTTT CATTGAT TTGGATCCTCCGAAATTTTTATCTTTGCTTTTATCAATGA-3'). The PCR product was subcloned into a pCR-TOPO kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) resulting in pCR-TOPO:Plp_0775 (Table 2). Afterwards, the DNA fragment containing *lp_0775* promoter was obtained from TOPO:Plp_0775 with *Bgl*II/*Nhe*I enzymes and cloned into purified backbone isolated from *Bgl*II/*Nhe*I-cut pSEC:Nuc vector, resulting in pLbSEC:Nuc (Fig. 2A, Table 2). This vector was established into *Lb. plantarum* strain.

For the production of E7 antigen, the DNA fragment encoding Nuc from pLbSEC:Nuc plasmid was replaced by E7 gene. For this, a DNA fragment encoding E7 was obtained from pSEC:E7 plasmid with *Nsi*I/*Eco*RI and cloned into pLbSEC:Nuc vector digested with the

same enzymes and replacing the corresponding DNA fragment of Nuc. The resulting plasmid pLbSEC:E7 (Fig. 2B) was established into *Lb. plantarum* strain.

2.6 Bacteria transformation and protein extraction. Plasmid were first established by electrotransformation in *E. coli* (Gibson *et al.*, 1984) or *L. lactis* (Langella *et al.*, 1993) for DNA amplification. pBifSEC:Nuc and pBifSEC:E7 were then transferred to *B. infantis* DSM20088 using the following protocol: to prepare competent cells an overnight culture of *B. infantis* grown in MRS-C was diluted 1:50 in the same medium supplemented with 0.5M of saccharose and culture pursued until OD_{600nm}= 0.5. Then cells were incubated in ice for 15 min, recovered by centrifugation and washed with buffer (saccharose 0.5M, glycerol 10%). The final pellet was suspended in 1/250 of initial volume in the wash buffer and aliquots were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Conditions of electrotransformation were: a single electric pulse with Gene Pulser Apparatus (BioRad, Hercules, CA, USA) at 2.2 kV/cm pulse strength (4–5 set pulse numbers), 25 µF and 200 Ω with 100 mm electro-cuvette (BioRad). One ml of MRS-C medium was immediately added and cells were incubated for 3h at 37°C. Finally, different dilutions were plated in MRS-C containing antibiotic (2 µg/ml of chloramphenicol) for recombinant clones selection after 48-72 h of culture at 37°C in anaerobic conditions.

pLbSEC:Nuc and pLbSEC:E7 plasmids were also first established by electrotransformation in *E. coli* or *L. lactis* for DNA amplification and then transferred to *Lb. plantarum* WCFS1 (JCP) by electrotransformation as previously described (Cortes-Perez *et al.*, 2005).

Since the expression of Nuc and E7 proteins is controlled by stress-inducible promoters (P_{dnaK} and P_{lp0775}), the induction was performed using bile salts. Briefly, saturated cultures of either *Lb. plantarum* or *B. infantis* were centrifuged (5000 rpm, 10min at room temperature). Pellets were resuspended in culture media supplemented with 0.06% of bile salt (50% sodium cholate and 50% sodium deoxycholate, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) (Amor *et al.*, 2002) and incubated for 3 hours at 37°C. Then, proteins, both from cells (C) and culture supernatant (S) samples were extracted from *B. infantis* and *Lb. plantarum* as follows: After incubation of cells with bile salt, culture media were centrifuged (5000 rpm, 10min, room temperature), the supernatants were removed, and cells were washed with Phosphate Buffer Saline (PBS) to remove bile salt. *B. infantis* cell pellet was then lysed for 2 hours at 37°C using TES-Lys buffer containing lysostaphin (0.5units/ml/ Sigma), lysozyme (500µl/ml / Sigma), mutanolysin (50µg/ml / Sigma) with anti-protease (protease inhibitor cocktail

(Roche). *Lb. plantarum* cell pellet was resuspended in PBS, and lysed on ice using a sonicator (Bioblock vibracell, power 100 W) with two cycles of 5s separated by 10s. Cellular proteins were then diluted and heated (5min; 98°C) in dithiothreitol (DTT, Sigma) loading buffer (DTT-LB; Sigma) (50% of final volume) and Sodium Diodecyl Sulfate 20% (33% of final volume) and kept at -80°C until western blot analysis. Proteins of supernatant were precipitated by an incubation of 10 mn in ice in presence of 100% trichloroacetic acid (D1/20) followed by a centrifugation (10 min; 13000rpm; 4°C). The pellet was then resuspended and heated (5min at 98°C) in 50% of final volume of sodium hydroxide 50mM and 50% of DTT-LB) and kept at -80°C until western blot analysis. Because of the short half-life of E7 antigen (Reinstein *et al*., 2000), western blot analysis were performed in the week following protein extraction.

Nuclease and E7 were detected by western blot essentially as previously described (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002). For *Lb. plantarum* and *B. infantis*, proteins obtained from C and S samples were submitted to a 12% sodium dodecyl sulphate (SDS)–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto PVDF membrane (Amersham Biosciences, Saclay, France). After blocking with TBS-T/5% milk, membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibody followed by incubation with appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). The signal was detected using the ECL + kit (Amersham Biosciences). E7 was detected using a mix of HPV16-E7 goat monoclonal IgG, HPV16-E7 goat polyclonal IgG and HPV16-E7 mouse monoclonal IgG_1 (Santa cruz biotechnology, Inc., California, USA; 1/500). Nuclease was detected using anti-Nuc antibodies (Eurogentec) (Le Loir *et al*., 1998).

2.7 Mice and immunization protocol. Specific pathogen-free C57BL/6 mice (females, 6–8 wk of age; Charles River Breeding Laboratories) were housed in a pathogen-free isolator under sterile conditions with water and fed ad libitum in the animal facilities of the UEPSD at the National Institute of Agricultural Research (Jouy-en-Josas, France). All experiments were performed according to protocols in accordance with institutional guidelines.

The preparation of live bacterial inocula for immunization experiments was performed as follows: wild-type and recombinant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains producing E7 were cultured as described above. After overnight culture cellular pellets were harvested by centrifugation at 5000 rpm at 4°C and washed three times with sterile PBS. The pellet was suspended in PBS to a final concentration of $5x10^9$ CFU. Plate counts were performed with

all inoculum to corroborate the CFU administered and E7 production was controlled by western blot as described above.

For immunization, groups of mice (*n*=7) were administered intragastrically (*i.g.*) with with $5x10^9$ CFU from each strain in 200 µl of PBS. Three consecutive daily doses were administered at 2-week intervals (priming and two boosts). Control mice received either PBS.

2.8 Secretion of cytokines by activated splenocytes. Seven days after the last immunization mice were sacrificed by vertebral dislocation and spleen was removed. Splenocytes were obtained by mechanical dissociation of spleen followed by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Cells were then resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and plated (1,106 cells/well) on 24-well plate at 37°C under 5% CO_2. 2 µg of a synthetic E7 peptide (RAHYNIVTF) was added to the culture medium to investigate the peptide-specific cellular response. After 24 h of incubation, IFN-γ and Il-5 concentrations in the culture supernatants were determined by specific ELISA according to the manufacturer's instructions (e-Bioscience San Diego, CA. USA).

2.9 Measurement of E7-specific CD4+ cells. The stimulation of E7-specific lymphocytes in freshly isolated spleen cells from non-immunized and immunized mice with recombinant bacteria were measured by flow cytometry of antigen-specific $CD4^+$ T-helper (T_H) lymphocytes. Briefly, splenocytes isolated as described above were separated on a Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) density gradient and a single cell suspension of splenocytes $5x10^6$ cells/well were stimulated in duplicate with 5 µg/ml of purified E7 protein (Watterlot *et al*., in preparation) concanavalin A (1 µg/mL) as positive control or PBS as negative control, in a 24 well plate containing 1 ml of RPMI medium 1640 supplemented with 5mM L-glutamine, antibiotics (penicillin/streptomycin), 50µM 2-Mercaptoethanol and 10% FCS at 37ºC under 5% CO_2. After 72h, supernatants were harvested and cells were washed and stained using monoclonal antibodies conjugated: anti CD4-FITC (anti-mouse CD4-FITC, BD Bioscience) and rat IgG2a conjugate a FITC were used as isotype. The cells were then washed twice and fixed with CellFix solution (Becton-Dickinson). The frequencies of CD4+ T lymphocytes specifically activated by E7 antigens were determined by flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson). Data acquisition (50,000 events) and analysis of the CD4+ T lymphocytes were carried out using CellQuest™ Pro Software (Becton Dickinson) according to the manufacturer's recommendations. Frequencies of responding T cells were calculated as percentages of the total positive events.

2.10 Lymphocyte proliferation. Spleen cells were treated with carboxyfluorescein 15 min and then stimulated with either E7 protein at different concentrations: 0.65, 1.25, and 2.5 µg/ml or concavalin (1 µg/ml) for 4 days. The cells were then washed twice, fixed with CellFix solution (Becton-Dickinson) and analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson).

2.11 Statistical analyses. Student's method was used to compare the difference between groups and controls using JMP^{TM} statistic software. P values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Expression of Nuc by *Lb. plantarum* and *B. infantis.* To obtain a functional vector allowing a controlled-targeted protein production in Bifidobacteria spp., we cloned a stress-inducible promoter from *B. longum* 89/11 strain in pSEC:Nuc plasmid. This vector was established in *B. infantis* DSM20088 and recombinant strain named BIF(Nuc). In order to be able to compare protein production and immunogenicity of recombinant BIF(Nuc) with *Lb. plantarum*, we also we cloned a stress-inducible promoter from *Lb. plantarum* WCFS1 in pSEC:Nuc plasmid and the resulting vector was established in *Lb. plantarum* WCFS1 to obtain LB(Nuc). Once obtained two recombinant strains, the ability to produce and secrete Nuc was analyzed by Western blot from non-induced and bile salts-induced C and S fractions (only the results for Bifidobacteria are shown in Fig. 3). In the absence of bile salts, a weak band in the cell fraction and corresponding to Nuc protein was detected in both of BIF(Nuc) and LB(Nuc) strains. In contrast, induced-cultures of both strains revealed a stronger band in the cell fraction at the expected size for Nuc (left lane, positive control: commercial purified NucA). However, no signal was detected in the supernatant of neither strain. No signal was detected in the negative-control strains BIF(WT) and LB(WT).

3.2 Expression of E7 by *Lb. plantarum* and *B. infantis.* HPV-16 E7 protein is constitutively produced in HPV-related cervical cancer and considered to be a good antigen candidate for the development of new vaccines against this neoplasia (Smotkin and Wettstein, 1986). For this reason we believe that E7 represents an attractive therapeutic molecule to be produced by *Bifidobacterium* spp.

In order to produce an inducible E7 protein in Bifidobacteria and Lactobacilli, pBifSEC:E7 and pLbSEC:E7 vectors were constructed (see material and methods) and established in *B. infantis* and *Lb. plantarum* to obtain BIF(E7) and LB(E7), respectively. Afterwards, the ability of both strains to produce and secrete E7 was analyzed by Western blot from non-induced and bile salts-induced C and S fractions (Fig. 4). As observed for E7 detection, in the absence of bile salts, a very weak band in the cell fraction at the expected size for E7 was detected in both of BIF(E7) and LB(E7) strains. Induced-cultures of both strains revealed a stronger band in the cell fraction corresponding to E7. However, once again no signal was detected in the supernatant of neither strain. No signal was detected in the negative-control strains BIF(WT) and LB(WT).

3.3 Comparison of immune response in mice after intragrastic administration of either *B. infantis* or *Lb. plantraum* producing E7 antigen under the transcriptional control a stress-inducible promoter. To determine the impact of the vector (*ie*. Bifidobacteria *vs* Lactobacilli) on the stimulation of an antigen-specific response, we analyzed the secretion of IFN-γ and IL-5 cytokines by *in vitro* activated spleen cells from immunized animals. IFN-γ and IL-5 production was measured by ELISA. As shown in Fig 5A, only BIF(E7) treatment induce a significant increase of IL-5 production compared to either LB(WT), LB(E7) or BIF(WT). Levels of IFN-γ revealed significant differences between BIF(E7) and BIF(WT) treatments (Fig. 5B). A significant difference was also observed in IFN-γ levels between BIF(E7) and LB(WT) and between LB(E7) and LB(WT). As observed in the Fig. 5A and 5B, IFN-γ levels revealed a weak immunomodulation with BIF(WT) as a vector itself while LB(WT) has no effect. This suggest, that *B. infantis* is more effective to induce a non-specific immune response in mice than *Lb. plantarum*.

We also measured T-cell proliferation after immunization with recombinant strains. For this, we evaluated T-cell proliferation from reactivated splenocytes of immunized animals with two E7 peptide (DSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTLRL – RAHYNIVTF) (Fig. 6A). The results revealed a higher increase in CD4+ T-cell population with BIF(E7) administration when compared to BIF(WT), LB(E7) and LB(WT) (Fig. 6A). These results indicated that only BIF(E7) is able to induce successfully an antigen-specific systemic immune response. These experiments also confirm (as observed with cytokine secretion experiments) the influence of the vector itself to stimulate immune response (Fig. 6A). In addition, similar experiments were performed with reactivated splenocytes with

concavaline A and the results confirm that only BIF(E7) induce a significant systemic immune response and that E7 is more immunogenic when delivery by this vector (Fig. 6B).

DISCUSSION

Development of new live bacterial vectors is crucial for improving mucosal delivery of therapeutic proteins. In this work we thus decided to evaluate the impact of Bifidobacteria as a new mucosal vector. First, we constructed a functional plasmid which allows a heterologous protein production under the transcriptional control a *dnaK* promoter in *Bifidobacterium* spp. We opted to clone *dnaK* promoter, because dnaK operon encode heat-shock proteins partially involved in the adaptation and survival of some bacteria in the gut (Sanchez *et al.*, 2005). Since in bifidobacteria, transcription of heat-shock proteins, and more particularly dnaK, is greatly enhanced by bile salts all inducible *in vitro* experiments were performed with bile salts. Western blot results confirmed that our construction is functional in Bifidobacteria and more important that stress-induction allows us to enhance two/three-fold the production of our protein of interest. Unfortunately, despite this construction was designed to secrete heterologous proteins, no protein (ie. Nuc and E7) was detected by Western blot in S samples. Two possible reasons could explain this deficiency: either the quantities of secreted-protein are so low to be detected by Western blot experiments or difference in SP specificity. Indeed, in this work we used a SP issued from *L. lactis*, SP_{Exp4}, and although either Nuc or E7 fused at this SP may be efficiently recognized by the secretion and processing machinery in several LAB (Poquet *et al*., 1998; Bermudez-Humaran *et al*., 2003b; Morello *et al*., 2008) is not the case for Bifidobacteria. However, we also transformed two others species of bifidobacteria (*B. longum* and *B. bifidum*) with pBifSEC:Nuc and pBifSEC:E7, our positive results demonstrate the potential use of this plasmids to produce protein of health interest within different species of Bifidobacteria (dated not showed).

Previously, we have demonstrated that stimulation of immune response is possible with recombinant LAB in spite of a low rate secretion (Chatel *et al*., 2008; Cortes-Perez *et al*., 2009).This is explain by the fact that some LAB (*Lactococcus; Lactobacillus*) do not resist passage through the stomach and GIT and are then rapidly lysed releasing *in vivo* the protein of interest (Grangette *et al*., 2004). To confirm that this is also true for recombinant Bifidobacteria we tested our strain in *in vivo* experiments. Intragastric immunization of mice

with recombinant *B. infantis* strain producing HPV-16 E7 antigen was found to be more effective than *i.g.* immunization with recombinant *Lactobacillus* producing similar quantities of the same antigen to induce an antigen-specific mucosal and systemic immune response. Indeed, splenocytes obtained from mice immunized with BIF(E7) and restimulated *in vitro* produced higher IFN-γ and IL-5 cytokines than those obtained from mice immunized with LB(E7). We selected these cytokines because they are one of the most common and abundant secreted cytokines in HPV-16 infected patients (de Jong *et al*., 2004; Warrino *et al*., 2004; Warrino *et al*., 2005). We also evaluated production of E7-specific T-cell proliferation in immunized mice. The results revealed that mice administered with recombinant BIF(E7) produce significantly more E7-specific CD4+ T-cells than those obtained from mice immunized with LB(E7). These results could be due to the capacities of *B. infantis* to persist longer in the GIT and the properties of E7 antigen itself.

Some strains of *Bifidobacterium* are considering as a probiotic strain which can persist until 10 days in our organism (Sheehan *et al*., 2007) in contrast to *Lactobacillus* which persist one week only (Pavan *et al*., 2003). Moreover, *Bifidobacterium* is an anaerobic strain, it is perfectly adapted to colonize côlon (Schell *et al*., 2002; Klijn *et al*., 2005; Masco *et al*., 2007; Martins *et al*., 2009). It represents up to 90% of the total gut microbiota in breast-fed babies (Fanaro *et al*., 2003) and up to 15% in adults (Mueller *et al*., 2006). The presence of such high level of Bifidobacteria in the human GIT suggests that this genus is perfectly adapted to survive stress condition found in GIT (low pH, bile salts, etc…) (Sanchez *et al*., 2005; Collado and Sanz, 2007; Delgado *et al*., 2008; Alp, 2009; Gueimonde *et al*., 2009). These adaptations allow certainly recombinant strains of Bifidobacteria to survive and deliver a protein of interest in mucosal GIT. Since E7 antigen is a very labile protein rapidly degraded (Bermudez-Humaran *et al*., 2004) and *Lactobacillus* is supposed to be faster degraded during intestinal transit than *Bifidobacterium*, it is possible that E7 is degraded before it could induce an immune response. In contrast, *Bifidobacterium* is more adapt to resist during intestinal transit, feature which allows E7 antigen to escape of the degradation during transit through stomach and to be delivered *in situ* when bacteria arrived in small intestine. Once in the small intestine, activation of P_{dnaK} promoter by bile salts and consequently antigen production stimulate an optimal and higher immune response. Indeed, the activation of immune system is effected essentially by Peyer's patch localized in the bowel. Bifidobacteria which resisted to the transit is going to be able to interact with cells M or denditric cells present in the Payer's patch and so, activated the immune system (Macpherson and Harris, 2004). Altogether, these

results confirm that E7 antigen is more immunogenic when delivered by recombinant Bifidobacteria. We also confirmed that persistence, viability and immunomodulatory propriety of the bacterial vector itself plays a key role in the immune response.

Previous studies have demonstrated the interest in the use of *Bifidobacterium* as a drug delivery system for systemic therapies of metastatic breast cancer because of his capacities to grow in hypoxic solid tumors (Nakamura *et al*., 2002; Fujimori, 2006). Taking into account our study, Bifidobacteria represents an attractive vector to deliver therapeutic proteins via either systemic or mucosal routes.

REFERENCES

Alp, G.a.A., B. (2009) Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp*. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*.

Amor, K.B., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F.M., Akkermans, A.D., De Vos, W.M., and Abee, T. (2002) Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5209-5216.

Bermudez-Humaran, L.G., Langella, P., Miyoshi, A., Gruss, A., Guerra, R.T., Montes de Oca-Luna, R., and Le Loir, Y. (2002) Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in Lactococcus lactis. *Appl Environ Microbiol* **68**: 917-922.

Bermudez-Humaran, L.G., Langella, P., Commissaire, J., Gilbert, S., Le Loir, Y., L'Haridon, R., and Corthier, G. (2003a) Controlled intra- or extracellular production of staphylococcal nuclease and ovine omega interferon in Lactococcus lactis. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 307-313.

Bermudez-Humaran, L.G., Cortes-Perez, N.G., Le Loir, Y., Alcocer-Gonzalez, J.M., Tamez-Guerra, R.S., de Oca-Luna, R.M., and Langella, P. (2004) An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. *J Med Microbiol* **53**: 427-433.

Bermudez-Humaran, L.G., Langella, P., Cortes-Perez, N.G., Gruss, A., Tamez-Guerra, R.S., Oliveira, S.C. *et al*. (2003b) Intranasal immunization with recombinant Lactococcus lactis secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect Immun* **71**: 1887-1896.

Bermudez-Humaran, L.G., Corthier, G and Langella, P. (2004) recent advances in the use of Lactococcus lactis as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res. Devel. Microbiology* **8**: 147-160.

Chatel, J.M., Pothelune, L., Ah-Leung, S., Corthier, G., Wal, J.M., and Langella, P. (2008) In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Ther* **15**: 1184-1190.

Collado, M.C., and Sanz, Y. (2007) Induction of acid resistance in Bifidobacterium: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *J Appl Microbiol* **103**: 1147-1157.

Cortes-Perez, N.G., Lefevre, F., Corthier, G., Adel-Patient, K., Langella, P., and Bermudez-Humaran, L. (2007) Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *vaccine* **25**: 6581-6588.

Cortes-Perez, N.G., Ah-Leung, S., Bermudez-Humaran, L.G., Corthier, G., Langella, P., Wal, J.M., and Adel-Patient, K. (2009) Allergy therapy by intranasal administration with recombinant Lactococcus lactis Producing bovine beta-lactoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol* **150**: 25-31.

Cortes-Perez, N.G., Azevedo, V., Alcocer-Gonzalez, J.M., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R.S., Corthier, G. *et al*. (2005) Cell-surface display of E7 antigen from human papillomavirus type-16 in Lactococcus lactis and in Lactobacillus plantarum using a new cell-wall anchor from lactobacilli. *J Drug Target* **13**: 89-98.

De Jong, A., van Poelgeest, M.I., van der Hulst, J.M., Drijfhout, J.W., Fleuren, G.J., Melief, C.J. *et al*. (2004) Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res* **64**: 5449-5455.

Delgado, S., O'Sullivan, E., Fitzgerald, G., and Mayo, B. (2008) In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal Bifidobacterium species and selection of new probiotic candidates. *J Appl Microbiol* **104**: 1119-1127.

Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., and Vigi, V. (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* **91**: 48-55.

Fujimori, M. (2006) Genetically engineered bifidobacterium as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer* **13**: 27-31.

Gibson, J.F., Poole, R.K., Hughes, M.N., and Rees, J.F. (1984) Filamentous growth of Escherichia coli K12 elicited by dimeric, mixed-valence complexes of ruthenium. *Arch Microbiol* **139**: 265-271.

Grangette, C., Muller-Alouf, H., Hols, P., Goudercourt, D., Delcour, J., Turneer, M., and Mercenier, A. (2004) Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infect Immun* **72**: 2731-2737.

Gueimonde, M., Garrigues, C., van Sinderen, D., de los Reyes-Gavilan, C.G., and Margolles, A. (2009) Bile-inducible efflux transporter from Bifidobacterium longum NCC2705, conferring bile resistance. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3153-3160.

Kerckhoffs, A.P., Samsom, M., van der Rest, M.E., de Vogel, J., Knol, J., Ben-Amor, K., and Akkermans, L.M. (2009) Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients. *World J Gastroenterol* **15**: 2887-2892.

Klijn, A., Mercenier, A., and Arigoni, F. (2005) Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 491-509.

Kok, J., van der Vossen, J.M., and Venema, G. (1984) Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in Bacillus subtilis and Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **48**: 726-731.

Langella, P., Le Loir, Y., Ehrlich, S.D., and Gruss, A. (1993) Efficient plasmid mobilization by pIP501 in Lactococcus lactis subsp. lactis. *J Bacteriol* **175**: 5806-5813.

Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S.D., and Langella, P. (1998) A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in Lactococcus lactis. *J Bacteriol* **180**: 1895-1903.

Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**: 478-485.

Martins, F.S., Silva, A.A., Vieira, A.T., Barbosa, F.H., Arantes, R.M., Teixeira, M.M., and Nicoli, J.R. (2009) Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties. *Arch Microbiol* **191**: 623-630.

Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde, K., Swings, J., and Huys, G. (2007) In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of Bifidobacterium. *J Dairy Sci* **90**: 3572-3578.

Morello, E., Bermudez-Humaran, L.G., Llull, D., Sole, V., Miraglio, N., Langella, P., and Poquet, I. (2008) Lactococcus lactis, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* **14**: 48-58.

Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T. *et al*. (2006) Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1027-1033.

Nakamura, T., Sasaki, T., Fujimori, M., Yazawa, K., Kano, Y., Amano, J., and Taniguchi, S. (2002) Cloned cytosine deaminase gene expression of Bifidobacterium longum and application to enzyme/pro-drug therapy of hypoxic solid tumors. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 2362-2366.

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

Poquet, I., Ehrlich, S.D., and Gruss, A. (1998) An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to Lactococcus lactis. *J Bacteriol* **180**: 1904-1912.

Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A., and Schwartz, A. (2000) Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* **19**: 5944-5950.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanchez, B., Champomier-Verges, M.C., Anglade, P., Baraige, F., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A., and Zagorec, M. (2005) Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of Bifidobacterium longum NCIMB 8809. *J Bacteriol* **187**: 5799-5808.

Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G. *et al*. (2002) The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14422-14427.

Sheehan, V.M., Sleator, R.D., Hill, C., and Fitzgerald, G.F. (2007) Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain Bifidobacterium breve UCC2003. *Microbiology* **153**: 3563-3571.

Shortle, D. (1983) A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene* **22**: 181-189.

Smotkin, D., and Wettstein, F.O. (1986) Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4680-4684.

Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neirynck, S., Obermeier, F., Falk, W. *et al*. (2000) Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. *Science* **289**: 1352-1355.

Van Der Werf, M.J.a.V., K. (2001) Bifidobacteria: genetic modification and the study of their role in the colon.
. *journal of agricultural and food chemistry* **49**: 378-383.

Warrino, D.E., Olson, W.C., Scarrow, M.I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R.S., Da Silva, D.M. *et al*. (2005) Human papillomavirus L1L2-E7 virus-like particles partially mature human dendritic cells and elicit E7-specific T-helper responses from patients with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in vitro. *Hum Immunol* **66**: 762-772.

Warrino, D.E., Olson, W.C., Knapp, W.T., Scarrow, M.I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R.S. *et al*. (2004) Disease-stage variance in functional CD4(+) T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus-16 E7 epitopes. *Clin Cancer Res* **10**: 3301-3308.

zur Hausen, H. (1991) Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184**: 9-13.

TABLES LEGENDS

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Strains	Culture medium	Culture condition	reference
***B. longum* 89/11**	MRS, cystéine 0.5 %	37°C, anaerobiose condition	Colec. INRA. UEPSD (ATCC15707)
***B. infantis* DSM20088**	MRS, cystéine 0.5 %		Colec. INRA. UEPSD
***Lb.plantarum* WCFS1**	MRS	37°C, aerobiose condition	JCP
***L. lactis* MG1363**	M17, Glucose 5%	30°C, aerobiose condition	Recherches laitières INRA
E. coli TOP10	LB, Chl 10 µg/ml	37°C with agitation	Kit TOPO Invitrogen
E. coli TG1	LB, Chl 10 µg/ml		Colec Recherches laitières INRA UEC 11500

Table 2. Plasmids used in this study.

plasmids	Caractéristic	reference
pSEC :Nuc	Chloramphenicol	Morello et al., 2008
pSEC :E7		Bermudez et al., 2002
pCR-TOPO:dnak-Bif		This article
pbifSEC :Nuc		
pbifSEC :E7		
pCR-TOPO:Plp_o775		
pLbSEC :Nuc		
pLbSEC :E7		

FIGURES LEGENDS

Fig. 1. Map of pBifSEC:Nuc (A) and pBifSEC:E7 (B).

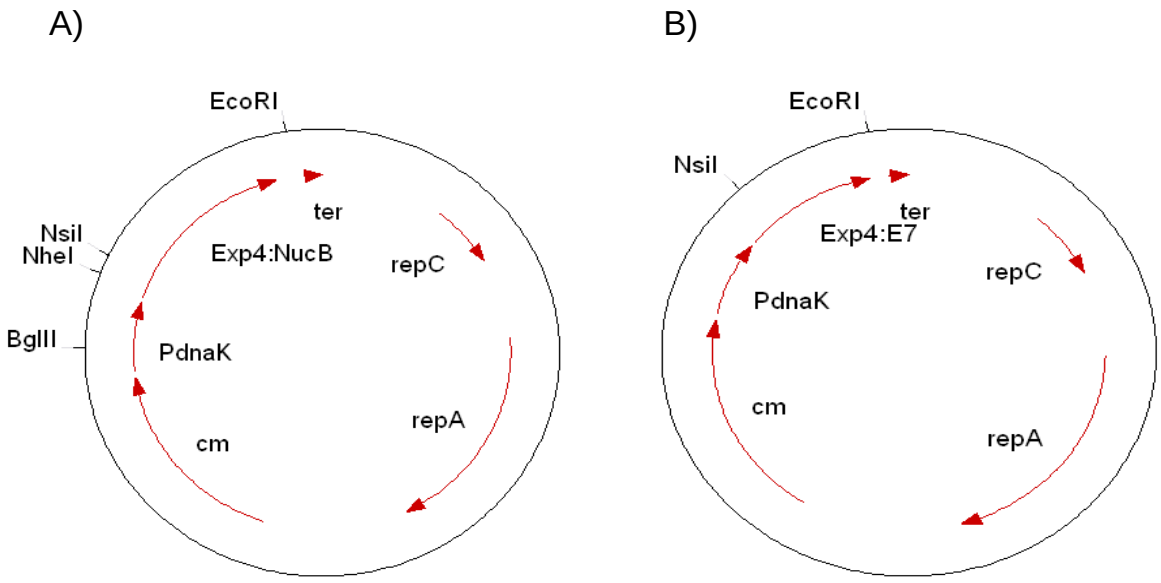


Fig. 2. Map of pLbSEC:Nuc (A) and pLbSEC:E7 (B).

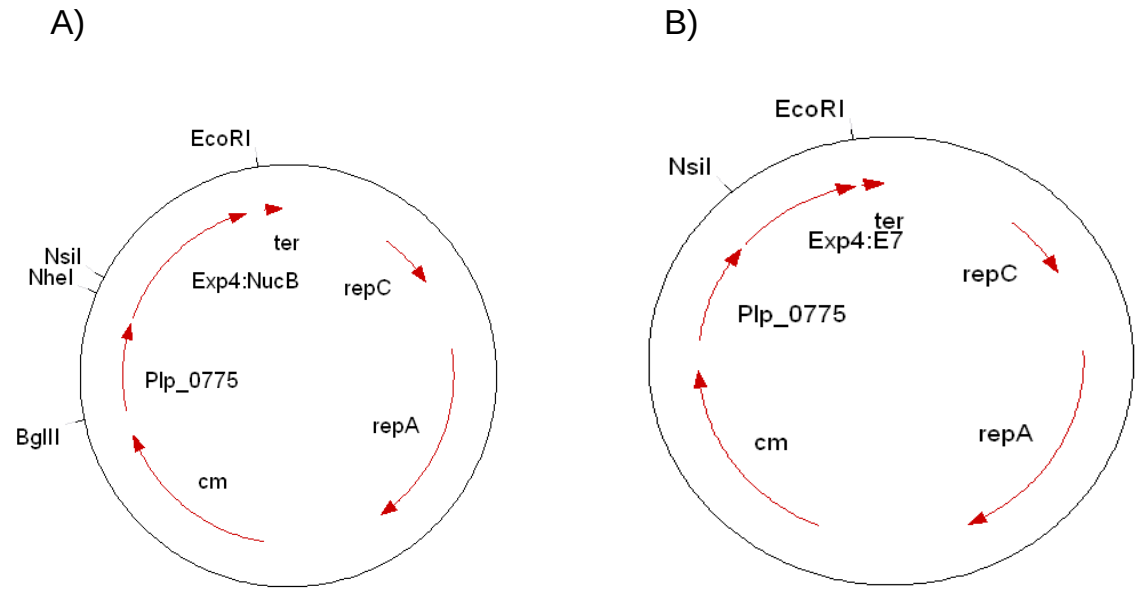


Fig. 3. Western blot analysis of recombinant *B. infantis* containing pBifSEC:Nuc. Production of Nuc were analyze without induction of p_{DnaK} on supernatant (S) and whole cell extracts (C) in recombinant *B. infantis* BIF (Nuc) then with induction of p_{DnaK} by addition of 0,06% of bile salt, on supernatant (Si) and whole cell extracts (Ci) in wild type *B. infantis* BIF (WT) and recombinant bacteria. Commercial purified nuclease (NucA) used as positive control.



Fig. 4. Western blot analysis of recombinant *B. infantis* (A) and *Lb. plantarum* (B) containing respectively pBifSEC:E7 and pLbSEC:E7. Production of E7 were analyze without induction of p_{DnaK} on supernatant (S) and whole cell extracts (C) in recombinant *B. infantis* BIF (E7), *Lb. plantarum* LB (E7), then with induction of p_{DnaK} by addition of 0,06% of bile salt, on supernatant (Si) and whole cell extracts (Ci) in wild type *B. infantis* BIF (WT), *Lb. plantarum* LB (WT) and recombinant bacteria.

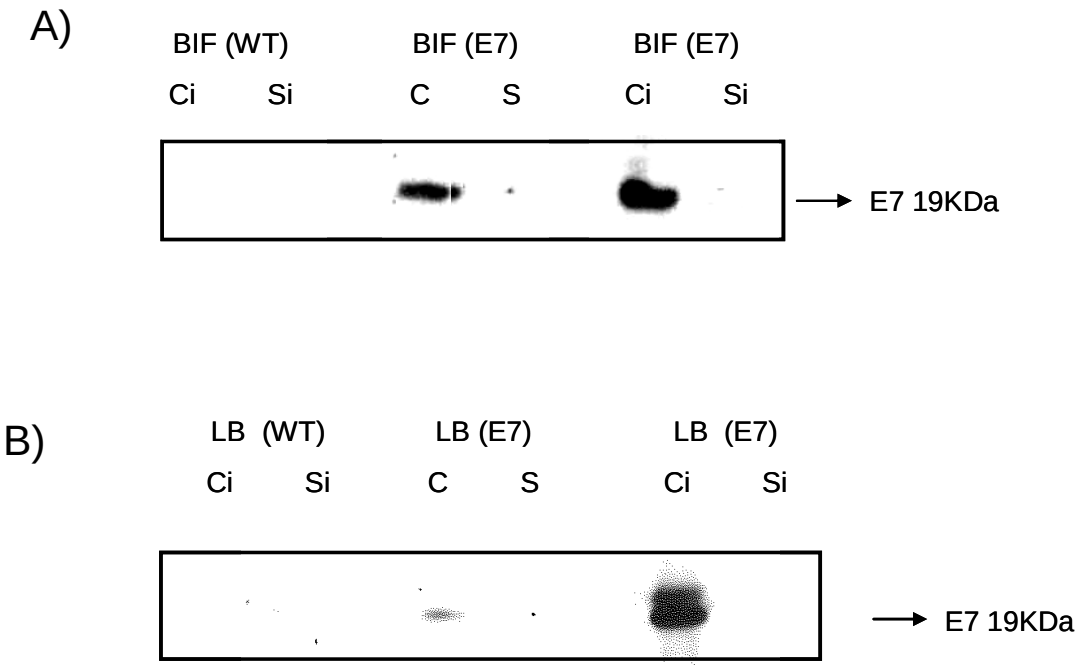


Fig. 5. Analysis of the IL-5 (A) and IFN-γ (B) response. Analysis of production IL-5 and IFN-γ were evaluate 35 days after oral immunization with $5X10^9$ wild type *B. infantis* BIF (WT), *Lb. plantarum* LB (WT) and recombinant *B. infantis* BIF (E7), *Lb. plantarum* LB (E7). Individual sample from splenocytes of two experiments of seven mice C57 BL/6 by group, immunized orally were tested by ELISA for specific IL-5 and IFN-γ. Significant differences is considering with Student's test, $p<0.05$.

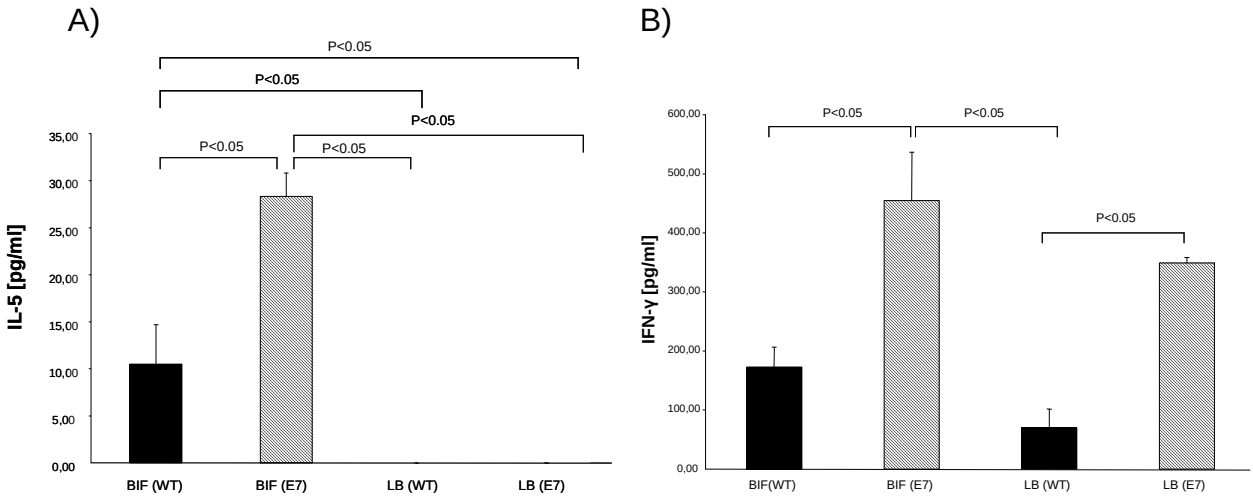
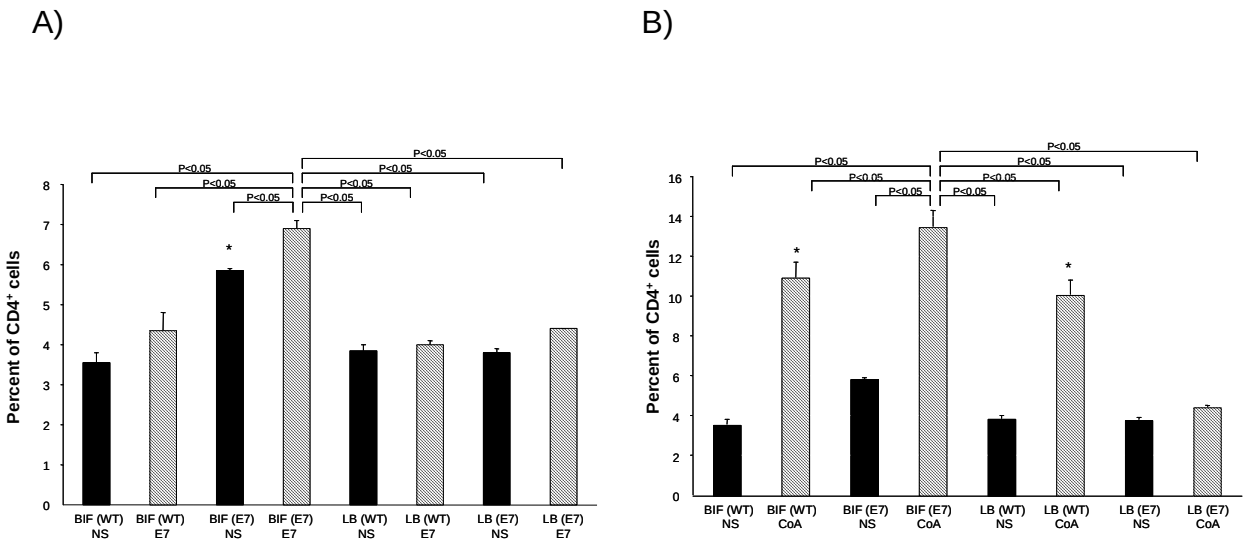


Fig. 6. Analysis of the proliferation of CD4+ cells. Analysis of percent of CD4+ cells were evaluate 35 days after oral immunization with $5X10^9$ wild type *B. infantis* BIF (WT), *Lb. plantarum* LB (WT) and recombinant *B. infantis* BIF (E7), *Lb. plantarum* LB (E7). Individual sample from splenocytes of two experiments of seven mice C57 BL/6 by group, immunized orally were analyzed after stimulation with E7 antigen (E7), concavalin A (CoA) or no stimulation (NS). Significant differences is considering with Student's test, $p<0.05$.



II. ETUDE DES EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES DE SOUCHES RECOMBINANTES ET COMMENSALES

Les MICI se caractérisent par un développement anormal et récurrent de l'inflammation. La recherche se focalise sur de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des bactéries en alternative aux traitements existant actuellement essentiellement composés d'immunosuppresseurs et de corticoides qui, en plus de leurs coûts élevés, peuvent induire de nombreux effets secondaires pour le patient. Les recherches actuelles ont démontré que le microbiote jouait un rôle essentiel dans le développement, l'induction ou l'arrêt de l'inflammation. Comme nous l'avons vu précédemment dans l'introduction, certaines bactéries ont un potentiel anti-inflammatoire, elles n'induisent aucun effet secondaire reconnu à l'heure actuelle et sont présentes dans l'environnement du patient, que ce soit au sein de l'alimentation ou en tant que bactéries commensales. Le développement de traitements alternatifs utilisant le potentiel de ces bactéries semble donc prometteur et c'est en s'appuyant sur ce concept, que nous avons souhaité étudier les effets anti-inflammatoires de souches commensales telles que *F. prausnitzii*.

Nous avons également porté nos efforts sur l'analyse de souches recombinantes produisant des molécules anti-inflammatoires telles que la SOD. Bien que la stratégie envisagée ne débouchera pas dans l'immédiat à une utilisation santé pour des raisons législatives d'interdiction des OGM à des fins santé en Europe, nous avons tout de même souhaiter développer cette stratégie. En effet, l'utilisation de BLGM nous permet d'étudier les mécanismes d'action des molécules hétérologues produites par la bactérie mais également d'approfondir une technique visant à utiliser la bactérie probiotique comme outil afin de délivrer *in situ* une protéine d'intérêt. Cette stratégie ayant l'avantage de permettre i) la diminution des coûts et des effets secondaires qu'aurait cette même protéine par injection systémique; ii) d'assurer sa protection vis-à-vis des stress rencontrés lors du transit du TD et iii) d'associer ces effets aux propriétés anti-inflammatoires intrinsèques de la bactérie, augmentant ainsi le potentiel thérapeutique de la molécule.

1) Etude des effets anti-inflammatoires de *Lactobacillus casei* BL23 produisant la catalase et la superoxyde dismutase à manganèse

- **Contexte de l'étude**

Nous avons précédemment décrit dans l'introduction le rôle du stress oxydant dans les pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin. En effet lors d'une inflammation, les cellules immunitaires humaines sécrètent une grande quantité de DAO tels que le peroxyde d'hydrogène ou le radical superoxyde. Ces DAO, provoquent un stress oxydant et induisent la production de molécules pro-inflammatoires au niveau des cellules intestinales et perpétuent ainsi l'inflammation (Simmonds *et al.*, 1992). Certaines enzymes permettent de lutter contre ce stress oxydant, c'est le cas de la SOD qui réduit le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène ou encore de la CAT qui est capable de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. La présence de ces enzymes va permettre d'agir d'une part, sur la diminution du stress oxydant et d'autre part, sur la régulation des infiltrats lymphocytaires permettant ainsi de diminuer l'inflammation (Hardy *et al.*, 1994).

Plusieurs travaux ont démontré les effets positifs de la SOD sur différents modèles reproduisant une inflammation (Kruidenier *et al.*, 2003b) mais l'originalité de notre étude porte sur l'analyse des effets anti-inflammatoires des deux enzymes de détoxification majeures de l'organisme, la SOD et la CAT en association ou non sur différents modèles d'étude *in vitro* et *in vivo*.

- **Objectifs et stratégies**

Nous avons précédemment démontré que la production de la CAT à manganèse (MnKat) par *Lb. casei* BL23 permettait d'augmenter significativement le taux de survie de la souche lors d'une exposition à un stress oxydant (Rochat *et al.*, 2006). L'administration par voie intragastrique de *Lb. casei* BL23 ou *Lb. casei* BL23 produisant la CAT (BL23 MnKat) permettait d'induire une réduction significative d'une inflammation modérée induite au DSS (1%) sur des souris (Rochat *et al.*, 2007). Aucun effet de la CAT n'a été observé mais les réactions de détoxification des DAO sont nombreuses et l'action de cette seule enzyme ne

constitue pas une réponse complète au stress oxydant. Lors de ce travail, nous avons donc souhaité déterminer si la supplémentation en SOD, pouvait augmenter l'effet anti-oxydant de BL23 MnKat observé précédemment. Pour cela, nous avons cloné une SOD à Manganèse (MnSOD) issues de *L. lactis* MG1363 dans la souche de *Lb. casei* BL23 (BL23 MnSOD) puis, nous avons comparé l'effet de l'administration intragastrique de cette souche recombinante, seule ou en association avec BL23 MnKat sur un modèle de colite sévère induite au DSS (3%) ainsi que sur des modèles *in vitro* d'étude du stress oxydant.

- **Résultats**

Les résultats sont décrits dans l'article « Intragastric administration of a superoxide dismutase producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice » p°146.

- **Conclusions et perspectives**

Nous avons souhaité dans un premier temps analyser les effets de nos mutants sur la diminution du stress oxydant en modèle cellulaire. Les résultats obtenus ont montré une diminution significative du stress oxydant lorsque les cellules sont mises en co-incubation avec BL23 MnSOD. A l'inverse, aucun effet n'a pu être démontré en ce qui concerne la souche BL23 MnKat et ce, sur les deux modèles cellulaires testés, à savoir des cellules de macrophages d'origine porcine ainsi que des splénocytes isolés de rates de souris. L'activité biologique de la souche recombinante BL23 MnSOD ainsi démontrée, nous avons alors analysé les effets anti-inflammatoires de nos mutants en association ou non dans un modèle d'inflammation intestinale sévère induite au DSS (3%). Les résultats obtenus sur deux expérimentations indépendantes utilisants des groupes de 10 souris montrent que l'administration de BL23 MnSOD seule ou en association avec BL23 MnKat permet de réduire significativement l'inflammation de par la préservation de l'intégrité de l'épithélium intestinal, la prévention des dommages causés aux cryptes et la diminution d'infiltrats lymphocytaires. Ces résultats, confirment ainsi les précédents travaux effectués en modèle de colite modérée (Rochat *et al.*, 2007) ainsi qu'en modèles d'études *in vitro.*

Pour conclure, nous avions précédemment démontré sur un modèle de colite modérée au DSS (1%) : i) que l'administration intragastrique de *Lb. casei* BL23 MnKat permettait de réduire l'inflammation d'un point de vue clinique et histologique et ii) que la CAT ne contribuait pas à cet effet. Dans ce projet, nous avons démontré que la SOD permettait de diminuer

l'inflammation qu'elle soit seule ou en association avec la CAT, ce qui suggère i) que la CAT n'augmente pas le niveau de protection dans un modèle murin de colite sévère et ii) que l'effet anti-inflammatoire observé peut être attribué à la SOD.

- **Article : Intragastric administration of a superoxide dismutase producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice**

Intragastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice

Laurie Watterlot[a], Tatiana Rochat[a], Harry Sokol[a], Claire Cherbuy[a], Ismael Bouloufa[a], François Lefèvre[b], Jean-Jacques Gratadoux[a], Edith Honvo-Hueto[a], Stefan Chilmonczyk[b], Sébastien Blugeon[a], Gérard Corthier[a], Philippe Langella[a], and Luis G. Bermúdez-Humarán[a,*]

[a]*Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France.* [b]*Unité de Virologie-Immunologie, INRA, 78352 Jouy en Josas cedex, France.*

Keywords: Lactobacillus casei, lactic acid bacteria, probiotics, reactive oxygen species, superoxide dismutase, colitis

*Corresponding author. Mailing address: Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France. E-mail: luis.bermudez@jouy.inra.fr Phone: +33-134-65-24-63 Fax: +33-134-65-24-62.

ABSTRACT

Human immune cells release large amounts of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical and hydrogen peroxide *via* respiratory burst. In inflammatory bowel diseases, a sustained and abnormal activation of the immune response results in oxidative stress of the digestive tract and in a loss of intestinal homeostasis. We previously reported that heterologous production of the *Lactobacillus plantarum* manganese catalase (MnKat) enhances the survival of *Lb. casei* BL23 when exposed to oxidative stress. Anti-inflammatory effects were observed after *Lb. casei* BL23 oral administrations in moderate murine dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis, without added effects of the MnKat production. Here, we evaluated the protective effects obtained by an improved antioxidative strategy. The *Lactococcus lactis sodA* gene was expressed in *Lb. casei* BL23 which acquired an efficient manganese superoxide dismutase (MnSOD) activity. The effects of *Lb. casei* MnSOD alone or in combination with *Lb. casei* MnKat were compared first in eukaryotic cell PMA-induced oxidative stress model and then in severe murine DSS-induced colitis. Based on ROS production assays as well as colonic histological scores, a significant reduction of both oxidative stress and inflammation was observed with *Lb. casei* MnSOD either alone or in combination with *Lb. casei* MnKat. No added effect of the presence of *Lb. casei* MnKat was observed. These results suggest that *Lb. casei* BL23 MnSOD could have anti-inflammatory effects on gut inflammation.

1. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) constitute a group of disorders characterized by a chronic and relapsing inflammation of the gastrointestinal tract (GIT). The two most common forms of IBD are Crohn's disease and ulcerative colitis. Although the aetiology of IBD is still unknown, recent investigations suggest that inflammatory and immune responses, as well as maintenance of healthy microbiota, play a key role in their pathogenesis (Rambaud et al., 2004). It is well established that GIT inflammation is associated with an influx of neutrophils and macrophages consequently with the production of inflammatory mediators such as proteases, cytokines and reactive oxygen species (ROS) (Segui et al., 2005). ROS include the superoxide radical ($O_2°^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and the hydroxyl radical (HO°) (Keshavarzian et al., 2003). Their reactivity toward lipids, proteins and DNA causes both cytotoxic and mutagenic cellular damages (Grisham et al., 1990). To detoxify ROS, cells have evolved protective mechanisms *via* antioxidant enzymes such as superoxide dismutases (SOD) and catalases (CAT) which degrade $O_2°^-$ and H_2O_2 respectively, and thus prevent the formation of HO° (Wardman et al., 2007).

Recent studies have demonstrated that in the inflamed mucosa from IBD patients MnKat is up-regulated and MnSOD is produced in an inactive form, suggesting the important role of these enzymes in IBD onset (Kruidenier et al., 2003). The use of antioxidant enzymes to decrease amounts of ROS is thus a promising strategy to prevent and/or cure IBD.

Several studies have shown that lactic acid bacteria (LAB), such as lactobacilli, may play a preventing role on IBD (Gosselink et al., 2004; Mimura et al., 2004). In this context, we have recently showed that *Lb. casei* BL23 strain is able to attenuate a moderate Dextran Sodium Sulfate (DSS)-induced colitis in mice (Rochat et al., 2007). In this study, the production of an active MnKat by *Lb. casei* BL23 did not improve its anti-inflammatory effects (Rochat et al., 2007). Other recent studies have successfully reported the use of either

recombinant *Lb. gasseri* or *Lb. plantarum* strains to produce and deliver *in situ* biological active MnSOD to treat colitis in interleukin-10 (IL-10) knockout mouse model and in 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis in rats (Han et al., 2006; Carroll et al., 2007). The aim of this study is to investigate the effect of MnSOD and MnKat co-delivery by *Lb. casei* thus containing the action of two enzymes required for the main antioxidative enzymatic pathway. We first constructed a recombinant strain of the anti-inflammatory *Lb. casei* BL23 strain expressing a MnSOD enzyme. The abilities of *Lb. casei* BL23 MnSOD and *Lb. casei* BL23 MnKat to reduce oxidative stress were then evaluated using an *in vitro* model of eukaryotic cells. Finally the anti-inflammatory effects of *Lb. casei* BL23 MnSOD we tested either alone or in combination with *Lb. casei* BL23 MnKat on severe DSS-induced colitis in mice.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and plasmids used

All strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *L. lactis* was grown in M17 medium supplemented with 0.5 % glucose (GM17) at 30°C without agitation. *Escherichia coli* TG1 was grown in Luria-Bertani medium (LB) at 37°C with vigorous shaking. *Lb. casei* BL23 was grown in MRS medium at 37°C without agitation. Plasmids used in this study were pBS:KS^+ (Stratagene, France), pIL253 (Simon and Chopin, 1988) and pVE3874 (Rochat et al., 2006) carrying the *mnkat* gene from *Lb. plantarum* ATCC 14431 (Igarashi et al., 1996). Transformed bacteria were selected by addition of antibiotics as follows: ampicillin (Amp) 150 µg/ml, erythromycin (Ery) 200 µg/ml for *E. coli* and 5 µg/ml for *L. lactis* and *Lb. casei.*

2.2. DNA manipulations

Plasmid DNA isolation and general procedures for DNA manipulations were performed essentially as described previously (Sambrook et al., 1989). PCR amplification was performed with a thermal cycler (Applied Biosystem) by using Vent DNA polymerase (Promega). DNA sequences were confirmed by sequencing (MWG, Genomic Company, Germany).

2.3. Cloning of L. lactis sodA *gene*

Primers for *L. lactis sodA* gene PCR amplification were designed using the sequence of *L. lactis* MG1363 genome (Wegmann et al., 2007). Sequences of the forward and reverse primers are: (5'-AT**TCTAGA**AAGCCTGCTGGAGGCTA-3'; 5'- CC**CT CGAG**AAGATAAGCATTTATGT-3') with the restriction sites *Xba*I and *Xho*I, respectively. The amplified region (1247 bp) includes the complete *sodA* gene as well as its promoter region (461 bp upstream from the translational start) and terminator region (150 bp downstream from the stop codon). The PCR product was purified, digested with *Xba*I and *Xho*I (New England) and ligated into pBS:KS$^+$ resulting in pBSK$^+$SodA. This construction was established into *E. coli* TG1 by electroporation (Gibson, 1984) and positives clones were selected by plating on LB Amp 150 µg/ml.

2.4. Introduction of sodA *and* mnkat *in* L. lactis *and* Lb. casei BL23

To establish pBSK$^+$SodA into *L. lactis* and *Lb. casei*, we applied the same strategy as previously described for pVE3874 plasmid (Rochat et al., 2006): a co-integrate plasmid was constructed by ligation with the cloning vector pIL253 (Simon and Chopin, 1988) which

allows an efficient propagation at high copy number in Gram-positive bacteria with Ery selection. pBSK$^+$SodA and pIL253 plasmids were digested with *Xba*I and fused together by ligation in order to generate pILKS*sodA* (9072 bp). This construction was first established into *E. coli* TG1 by electroporation and plating on LB with both Amp 150 µg/ml and Ery 200 µg/ml. After purification, the plasmid structure was resolved using specific endonucleases restrictions. This plasmid was then transferred into *L. lactis* MG1363 and *Lb. casei* BL23 by electroporation (Cortez-Perez et al., 2005) and selection of recombinant clones by plating on medium containing 5 µg/ml of Ery. All plasmids sequences were confirmed by sequencing.

2.5. Measurement of superoxide dismutase and catalase activities

SOD activity was detected by zymogram and quantified by enzymatic assay performed using the Superoxide dismutase kit as recommended by suppliers (Cayman Chemicals). *L. lactis* and *Lb. casei* strains harboring pIL253 were used as control. Bacterial pellets collected from stationary growth phase cultures were washed in a non-denaturing buffer (50 mM potassium phosphate–0.1 mM EDTA, pH 7.8) and proteins extracted by mechanical disruption in a Fast Prep FP120. Protein concentration was assayed by Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard. For SOD activity staining, 20 µg of total protein extracts were separated by nondenaturing PAGE (12.5%). SOD activity was then detected according to (Buist et al., 1995). Briefly, gel was incubated in the presence of nitroblue of tetrazolium (NBT) (0.2 mg/ml) and riboflavine (10 mM) which produces O_2°, thereby reducing NBT in blue of formasian, a stable coloration. SOD activity prevents the reduction of NBT resulting in an uncolored area. CAT activity was assayed according to the method of Sinha (1972) as previously described (Rochat et al., 2006). Enzymatic activities were expressed as µmol/min/µg of protein.

2.6. Analysis of recombinant strains on eukaryotic cell model of oxidative stress

Oxidative burst was measured on a pig myelomonocytic cell line (POM cells) and on freshly isolated mice BALB/c splenocytes. POM cell line was established from peripheral blood mononuclear cells obtained from a slovenian pig in the UE 6th framework program "PathogenCombat" (Intergrated Project, contract no: Food-CT-2005-007081). Cells were maintained in DMEM medium (Cambrex) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Lonza) and glutamine 2 mM (Cambrex) at 37°C and 10% CO_2. Splenocytes were obtained according to (Bermudez-Humaran et al., 2003). Briefly, spleens were removed from five BALB/c mice (male, 7 weeks of age; Janvier, Le Genest Saint Isle, France) and splenocytes were separated on a ficoll-hypaque (Sigma) density gradient. Cells were immediately incubated in RPMI 1640 medium (Cambrex) complemented with 5% FBS (Lonza) at 37°C and 10% CO_2.

1 x 10^6 of either freshly POM cells, recovered with a non enzymatic cell dissociation solution (Sigma) for 1 min, or mice splenocytes were co-incubated with either 2 x 10^7 CFU of *Lb. casei* BL23 pIL253 (control), *Lb. casei* MnSOD or *Lb. casei* MnKat under the conditions described above for 2 hours. No acidification of the medium was observed with these co-incubation conditions (data not shown). POM cells were also incubated with SOD and purified bovine liver CAT proteins (15 U and 55 U respectively; Sigma). Then, the oxidative burst was induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) at a concentration of 80 µM and of 2 µM for POM and for splenocytes. The concentration of PMA used was determined by preliminary experiments: concentrations of PMA ranging from 50 nM to 160 µM were analyzed for POM cell line; 80µM induced maximal oxidative burst whereas cell viability is maintained at 80% (data not shown). Oxidative burst was quantified using flow cytometry as

a measure of ROS production following PMA activation. Flow cytometric assessement of the oxidative burst was based on the technique described by Bass et al. (1983). The assay depends upon the cell incorporating 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA at a concentration of 0,25 µM) a stable nonfluorescent probe . Under the action of ROS the probe is oxidised to the fluorescent dichlorofluorescein (DCF). DCF formation was measured after 20 and 90 mn of reagent addition respectively for POM and splenocytes. 10 000 cells were recorded for flow cytometry (FACS calibur, Becton Dickinson, equipped with an argon laser; 488 nm excitation). DCF green fluorescence was collected through a 530 nm emission filter. Fluorescence data were analysed using CELLQUEST software.

2.7. Animals and treatments protocol

BALB/c mice (male, 7 weeks of age; Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed in a pathogen-free isolator under sterile conditions to limit dissemination of the recombinant bacterial strains considered as genetically modified organisms, in the animal facilities of the Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif (INRA, Jouy-en-Josas, France). Food (UAR, Villemoisson, France) and water were consumed *ad libitum*. All experiments were performed according to protocols in accordance with institutional guidelines.

2.8. Induction of colitis

After acclimatization, colonic inflammation was induced by the addition of 3% (w/v) DSS (40 kDa; ICN n°160110) in drinking water for 7 days until sacrifice. The experimental protocol is presented in Fig. 3. The negative control group received phosphate buffered saline (PBS) (PBS group). The positive control group received 3% DSS (DSS group) and PBS. The 3

others groups received bacteria inocula daily two days before the start of DSS treatment and then until sacrifice. For live bacteria inocula, *Lb. casei* BL23 strains were grown as described above. Cellular pellets were harvested by centrifugation at 6000 *g* at 4°C for 10 min, washed and suspended in PBS to a final concentration of 2.5 x 10^{10} CFU/ml. Each mouse received 200 µl of the bacterial suspension by intragastric administration (5 x 10^{9} CFU/mouse/day). In the case of the co-administration each mouse was administered with 5 x 10^{9} CFU of each strain. Two independent experiments were carried out. 10 mice were used in each experiment.

2.9. Histological assessment of DSS-induced colitis

For histological assessment, a colon sample located in the most inflamed area was fixed in 4% paraformaldehyde acid, dehydrated in solvents according to classical histological procedures and embedded in paraffin. Four µm sections were stained with hematoxylin and eosin and examined blindly according to Dieleman et al. (1998) procedure (with a BX51 Olympus microscope).

2.10. Statistical analyses

Student's method was used to compare the difference between groups and controls for *in vitro* and *ex vivo* experiment using JMP™ statistic software. Wilcoxon's method with holm correction was used to compare the difference between groups and controls for *in vivo* experiment using R statistic software. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. In vitro *characterization of the recombinant* Lb. casei *BL23 strain expressing either MnSOD or MnKat.*

The *L. lactis sodA* gene (including native transcription and translation signals) was introduced in *Lb. casei* BL23 by cloning into the high copy number pIL253 plasmid (Simon and Chopin, 1988), resulting in pILKS*sodA*. To determine SOD activity in the resulting *Lb. casei* MnSOD strain, both enzymatic activity assay and zymogram were performed. As the positive control, pILKS*sodA* was also introduced in *L. lactis* (resulting in *L. lactis* MnSOD) to evaluate the SOD overproduction ensued by this plasmid. SOD activities of 107 µmol/min/mg and 1119 µmol/min/mg of total proteins extracts were measured in *L. lactis* control and MnSOD strains, respectively (Table 2). This 10 fold-higher SOD activity results from the increased *sodA* gene copy number. In *Lb. casei*, a weak SOD activity was measured in the control strain (0.6 µmol/min/mg) compared to the 300 fold-higher activity observed in MnSOD strain (325 µmol/min/mg; Table 2). Similar results were obtained using zymogram test. Indeed, the uncolored area resulting from SOD activity was observed in both *L. lactis* control and MnSOD strains as well as in *Lb. casei* MnSOD total protein extracts, in contrast to *Lb. casei* control strain (Fig. 1). Altogether, these results indicate that the recombinant *Lb. casei* MnSOD produces high-level of biologically active SOD enzyme.

Besides this efficient *Lb. casei* MnSOD-producing strain, an optimized MnKat-producing *Lb. casei* BL23 strain was then constructed. In fact, we previously observed that *Lb. casei* BL23 pLEM415*mnkat* strain had not added anti-inflammatory effects compared to those obtained with *Lb. casei* BL23 strain it-self in a murine moderate DSS-induced colitis (Rochat et al., 2007). To discard the hypothesis of a too low *mnkat* gene expression, the *mnkat* gene was introduced into pIL253 to increase the gene copy number and thus MnKat

production. Indeed, an 8 fold-higher CAT activity was measured in total protein extracts of the resulting *Lb. casei* BL23 pVE3874 strain compared to the previous one (Table 2). This strain was thus used in the next experiments.

3.2. MnSOD producing Lb. casei *BL23 strain decreases oxidative stress in cellular models.*

We then assessed the capacity of both recombinant *Lb. casei* MnKat and MnSOD strains to reduce oxidative stress in an experimental *in vitro* model. For this purpose, both POM cells (Fig. 2A) and mice splenocytes (Fig. 2B) were co-incubated with oxidative stress inducer PMA and living recombinant bacteria under non-acidic conditions and ROS production (amount of fluorescent DCF produced) was then monitored. When incubated with PMA alone, a 2-fold increase in fluorescent DCF was observed in both POM and splenocytes models when compared to the endogenous ROS production. In presence of *Lb. casei* pIL253 control strain, ROS amounts increase 2-fold in POM cells when compared to PMA alone (Fig. 2A). This increase can be due to the endogenous ability of bacteria to induce ROS production in eukaryotic cell models (Ha et al., 2005; Craig and Slauch, 2009). No significant effect was observed in both models in presence of *Lb. casei* MnKat compared to those obtained with the *Lb. casei* control strain (Fig. 2A and 2B). In contrast, a significant decrease of the ROS production was observed in both models in presence of *Lb. casei* MnSOD, confirming the antioxidative properties of this recombinant strain.

3.3. Characterization of DSS-induced colitis in mice treated with Lb. casei *BL23 MnSOD and MnKat strains.*

Previously, we demonstrated anti-inflammatory effects of *Lb. casei* BL23 strain in a murine model of moderate colitis induced by 1% of DSS (Rochat et al., 2007). To distinguish anti-inflammatory effects due to the bacterial carrier from those due to the antioxidative enzymes delivery, a more severe colitis model induced by 3% of DSS was used in the current study. The potential protective effect of *Lb. casei* MnSOD administration, alone or in combination with *Lb. casei* MnKat, was tested and compared to the *Lb. casei* BL23 pIL253 control strain effect. After 7 days of DSS and bacteria administration (Fig. 3), histological scores (*eg.* inflammation severity, extension of inflammation, histological damages and percentage of inflammatory in mucosa) were assessed and compared between all groups (Fig. 4 and 5). When compared to PBS control group (Fig. 4A), severe inflammation was observed in the DSS colitis control group with presence of infiltrating phagocytic leucocytes extent to the muscular external mucosa and the loss of structure in crypts and surface of epithelium (Fig. 4B and Fig. 5). This inflammation was partially prevented in mice treated with *Lb. casei* pIL253 control strain but without reaching statistical significance. As observed in Fig. 4C and 5, there is a moderate inflammation extent to the under mucosa, with a moderate loss of structure in crypts without reaching the surface of the epithelium. In contrast, mice treated with either *Lb. casei* MnSOD alone or in combination with *Lb. casei* MnKat displayed a significant improvement of the histological inflammation scores compared to control colitis group. We can observe in Fig. 4D, 4E and 5 the presence of a moderate inflammation which extent only to the mucosa, structure in crypts are partly kept. These results demonstrate i) that MnSOD production by *Lb. casei* BL23 can enhance the anti-inflammatory intrinsic properties of *Lb. casei* BL23 and ii) that there is no supplementary effect of MnKat.

3.4. Discussion

In our previous study, we observed an intrinsic anti-inflammatory effect of *Lb. casei* BL23 strain in moderate colitis in mice induced by 1% of DSS. Here, a recombinant *Lb. casei* BL23 strain producing biologically active MnSOD has been constructed in order to evaluate the potential synergistic anti-inflammatory effects of the strain itself and SOD delivery. We have demonstrated the antioxidative effect of *Lb. casei* MnSOD in two cellular models as well as its anti-inflammatory effect in a colitis murine model. Indeed, inflammation scores results showed that intragastric administration of *Lb. casei* MnSOD decreases the severity of colitis induced by administration of 3% of DSS in mice. In this more severe colitis model, *Lb. casei* pIL253 control strain has no significant protective effect on inflammation. These observations confirm the beneficial effect of exogenous SOD delivery in the tested conditions. Indeed, it has been previously shown that subcutaneous injection of SOD decreases colitis induced by TNBS in mice (Segui et al., 2004). However, due to the short half-life of SOD in the gastrointestinal tract (GIT) (less than 10 min; Turrens et al., 1984), our oral SOD delivery approach through a live bacterial vector is an attractive alternative. Moreover, *Lb. casei* BL23 is a non-pathogenic and non-invasive anti-inflammatory LAB and is thus a good candidate to deliver proteins of health interest, since as it has been shown for other LAB (Bermudez-Humaran et al., 2003, 2004). Furthermore, this oral route of administration could be of interest in the case of SOD or CAT delivery. Indeed, ROS might be eliminated at their site of production, *ie* in macrophage and neutrophils of the inflamed mucosa, to avoid tissue damage in the case of GIT inflammation (Craig and Slauch, 2009). Thus, the delivery of proteins through live bacterial vector could target more efficiently these cell types.

MnSOD and CAT enzymes are 2 partners of one of the key enzymatic antioxidative pathways. It has been shown an imbalance between these two enzymes in IBD: SOD is produced in an enzymatically inactive form and CAT production is not able itself to neutralize ROS accumulation (Kruidenier et al., 2003a, Kruidenier et al., 2003b). We thus tested the co-administration of *Lb. casei* MnSOD and *Lb. casei* MnKat strains. We previously did not observe anti-inflammatory effects due to the MnKat production on DSS 1%-treated mice (Rochat et al., 2007) and we have thus used an improved *Lb. casei* BL23 MnKat strain with 8 fold-higher CAT activity. Despite that, co-administration of both *Lb. casei* MnKat and *Lb. casei* MnSOD did not provide any supplementary beneficial effect. These results suggest that only SOD has a positive effect in ROS elimination in this DSS 3%-induced colitis model.

Recent studies have proposed some putative different mechanisms of action of MnSOD *in vivo.* According to Carroll et al. (2007), expression of *Lb. gasseri* MnSOD could protect the bacterial vector against ROS, enhancing thus its viability and prolonging the probiotic effect of the bacteria. According to Han et al. (2006, 2007), MnSOD is delivered in the GIT after lysis of bacterial vectors and could exert a direct action on ROS produced by immune cells. Our data obtained on cell lines shown a reduced oxidative stress after co-incubation of macrophages with *Lb. casei* MnSOD strain. However, we did not observe effect of bacterial lysates on the decrease of oxidative stress *in vitro* using POM cells (data not shown). This result indicates that bacteria have to be alive to reduce oxidative stress in this model.

We cannot exclude that the exogenous production of MnSOD could impact on the composition of the gut microbiota. It is now well established that, in humans, IBD is associated with a dysbiosis (Sokol et al., 2006, 2008). Moreover, Rochat et al. (2006) show that *Lb. casei* BL23 producing MnKat could extend *in vitro Lb. bulgaricus* viability in conditions of oxidative stress. Thus, SOD delivered by *Lb. casei* BL23 could play a role in the protection of commensal bacterial species against oxidative stress.

To conclude, as other proteins presenting a health interest, *in situ* delivery of MnSOD is a promising therapeutic approach for IBD. This protein reinforces the beneficial effect of the anti-inflammatory *Lb. casei* BL23 strain. To pursue the optimization of this strategy, the mechanisms of the protective action of *Lb. casei* BL23 strain remain to be understood.

ACKNOWLEDGMENTS

T. Rochat was recipient of a grant from Nestlé Nutrition France.

L. Watterlot was recipient of a grant from the department of Food Chain Microbiology 14 (MICA, INRA, France). We are grateful to Cencic A from Maribor university to give us POM cells.

REFERENCE

Acedo-Félix, E., Pérez-Martínez, G., 2003. Significant differences between *Lactobacillus casei subsp*. ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 67-75.

Bass, D.A., Parce, J.W., DeChatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas M., 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : A graded response to membrane stimulation. Journal of Immunology 130, 1910-1983.

Bermúdez-Humarán, LG., Cortes-Perez, NG., Le Loir, Y., Gruss, A., Rodriguez-Padilla, C., Saucedo-Cardenas, O., Langella, P., Montes de Oca-Luna, R., 2003. Fusion to a carrier protein and a synthetic propeptide enhances E7 HPV-16 production and secretion in *Lactococcus lactis*. Biotechnology Progress 19, 1101-04.

Bermúdez-Humarán, L. G., Cortes-Perez, N. G., Le Loir, Y., Alcocer-Gonzalez, J. M., Tamez-Guerra, R. S., Montes de Oca-Luna, R., Langella, P., 2004. An inducible surface

presentation system improves cellular immunity against E7 antigen after nasal administration with recombinant *lactococci*. Journal of Medical Microbiology 53, 1–7.

Bradford, MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Buist, G., Kok, J., Leenhouts, KJ., Dabrowska, M., Venema, G., Haandrikman, AJ., 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. Journal of Bacteriology 177, 1554-1563.

Carroll, IM., Andrus, JM., Bruno-Bárcena, JM., Klaenhammer, TR., Hassan, HM., Threadgill, DS., 2007. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. American Journal Physiololy Gastrointestinal Liver Physiololy 293, 729-738.

Cortes-Perez, NG., Azevedo, V., Alcocer-González, JM., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, RS., Corthier, G., Gruss, A., Langella, P., Bermúdez-Humarán, LG., 2005. Cell-surface display of E7 antigen from human papillomavirus type-16 in *Lactococcus lactis* and in *Lactobacillus plantarum* using a new cell-wall anchor from lactobacilli. Journal of Drug Targeting 13, 89-98.

Craig, M., Slauch, JM., 2009. Phagocytic superoxide specifically damages an extracytoplasmic target to inhibit or kill *Salmonella*. PLoS One 4, e4975.

Dieleman, LA., Palmen, MJ., Akol, H., Bloemena, E., Peña, AS., Meuwissen, SG., Van Rees, EP., 1998. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clinical and Experimental Immunology 114, 385-391.

Gasson, MJ., 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic *streptococci* after protoplast-induced curing. Journal of Bacteriology 154, 1-9.

Gibson, JF., Poole, RK., Hughes, MN., Rees, JF., 1984. Filamentous growth of *Escherichia coli* K12 elicited by dimeric, mixed-valence complexes of ruthenium. Archives Microbiology 139, 265-271.

Gosselink, MP., Schouten, WR., van Lieshout, LM., Hop, WC., Laman, JD., Ruseler-van Embden, JG., 2004. Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. Disease of the Colon and Rectum 47, 876-884.

Grisham, MB., Gaginella, TS., von Ritter, C., Tamai, H., Be, RM., Granger, DN., 1990. Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport, and epithelial cell viability. Inflammation 14, 531-542.

Ha, H., Lee, HB., 2005. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. Nephrology Suppl:S7-10.

Han, W., Mercenier, A., Ait-Belgnaoui, A., Pavan, S., Lamine, F., van Swam, II., Kleerebezem, M., Salvador-Cartier, C., Hisbergues, M., Bueno, L., Theodorou, V., Fioramonti, J., 2006. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. Inflammatory Bowel Disease 11, 1044-1052.

Han, W., Fioramonti, J., 2008. Anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. American Journal Physioloy Gastrointestinal Liver Physioloy 194, G353.

Igarashi, T., Kono, Y., Tanaka, K., 1996. Molecular cloning of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. Journal of Biological Chemistry 271, 29521-29524.

Keshavarzian, A., Banan, A., Farhadi, A., Komanduri, S., Mutlu, E., Zhang, Y., Fields, JZ., 2003. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. Gut 52, 720-728.

a)Kruidenier, L., Kuiper, I., Van Duijn, W., Mieremet-Ooms, MA., van Hogezand, RA., Lamers, CB., Verspaget, HW., 2003. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. Journal of Pathology 201, 7-16.

b) Kruidenier, L., Kuiper, I., Van Duijn, W., Marklund, SL., van Hogezand, RA., Lamers, CB., Verspaget, HW., 2003. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. Journal of Pathology 201, 17-27.

Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, IC., Nicholls, RJ., Gionchetti, P., Campieri, M., Kamm, MA., 2004. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. Gut 53, 108-114.

Rambaud, JV., Buts, JP., Corthier, G., Flourié, B., 2004. Flore microbienne intestinale. John Libbey Eurotext, Paris, pp 151-160.

Rochat, T., Gratadoux, JJ., Gruss, A., Corthier, G., Maguin, E., Langella, P., van de Guchte, M., 2006. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H_2O_2 and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. Applied Environmental Microbioloy 72, 5143-5149.

Rochat, T., Bermúdez-Humarán, L., Gratadoux, JJ., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., Langella, P., 2007. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. Microbial Cell Factories 20, 6-22.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Seguí, J., Gironella, M., Sans, M., Granell, S., Gil, F., Gimeno, M., Coronel, P., Piqué, JM., Panés, J., 2004. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing

oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. Journal Leukocyte Biology 76, 537-544.

Seguí, J., Gil, F., Gironella, M., Alvarez, M., Gimeno, M., Coronel, P., Closa, D., Piqué, JM., Panés, J., 2005. Down-regulation of endothelial adhesion molecules and leucocyte adhesion by treatment with superoxide dismutase is beneficial in chronic immune experimental colitis. Inflammatory Bowel Disease 11, 872-882.

Simon, D., Chopin, A., 1988. Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. Biochimie 70, 559-566.

Sinha, A. K., 1972. Colorimetric assay of catalase. Analytical Biochemistry 47, 389-394.

Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I., Marteau, P., Doré, J., 2006. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Disease 12, 106-111.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, LG., Gratadoux, JJ., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, JP., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, HM., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proceedings of the National Academy of Science 105, 16418-16425.

Turrens, JF., Crapo, JD., Freeman, BA., 1984. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. Journal of Clinical Investigation 73, 87-95.

Wardman, P., 2007. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, Pitfalls, and Prospects. Free radical biology and medicine 43, 995-1022.

Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, MJ., Kuipers, OP., van Sinderen, D., Kok, J., 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis subsp. cremoris* MG1363. Journal of Bacteriology 189, 3256-3270.

TABLES LEGENDS

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Characteristics	References
Strains		
E. coli TG1	*supE hsd 5 thi (lac-proAB) F (traD36 proAB-lacZ M15)*	1
Lb. casei BL23	Wild-type strain	2
L. lactis MG1363	Wild-type strain	3
Plasmids		
pIL253	Em^r	4
pBS:KS+	Am^r	Stratagene®
pBSK+SodA	Am^r; pBS:KS+ carrying *L. lactis sodA* gene under the control of native promoter	This work
pILKS*sodA*	Em^r Am^r; cointegrate between pIL253 and pBSK+SodA	This work
pVE3874	Em^r Am^r; cointegrate between pIL253 and pMN115 carrying *Lb. plantarum* ATCC14431 *mnkat* gene	5

1. Gibson, T. J. 1984. PhD thesis. University of Cambridge, Cambridge, England.
2. Acedo-Felix, E., and G. Perez-Martinez. 2003. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:67–75.
3. Gasson, M. J. 1983. J Bacteriol 154, 1–9.
4. Simon, D., and A. Chopin. 1988. *Biochimie 70:559–566.*
5. Rochat T. *et al* 2006 *AEM*

Table 2. Measurement of superoxide dismutase and catalase activities in strains.

Strain	SOD activity (µmol/min/mg)	SEM
Lb. casei BL23 pIL253	0.6	0.5
Lb. casei BL23 pILKS*sodA*	325	19
L. lactis pIL253	107	6
L. lactis pILKS*sodA*	1119	50

Strain	CAT activity (µmol/min/mg)	SEM
Lb. casei BL23 pIL253	1	*0.1*
Lb. casei BL23 pVE3874	129	*12*
* *Lb. casei* BL23 pLEM:*mnkat*	16	*2*

* From data published in Rochat *et al* (2006)

FIGURES LEGENDS

Fig 1. SOD activity staining in protein extracts separated by nondenaturing PAGE. Twenty µg of total proteins extracts from stationary growth phase cultures of *Lb. casei* BL23 and *L. lactis* MG1363 containing either pIL253 (control) or pILKS*sodA* (MnSOD) were submitted to nondenaturing PAGE. SOD activity was then revealed using the method of Buist *et al.* (1995; see material and methods).

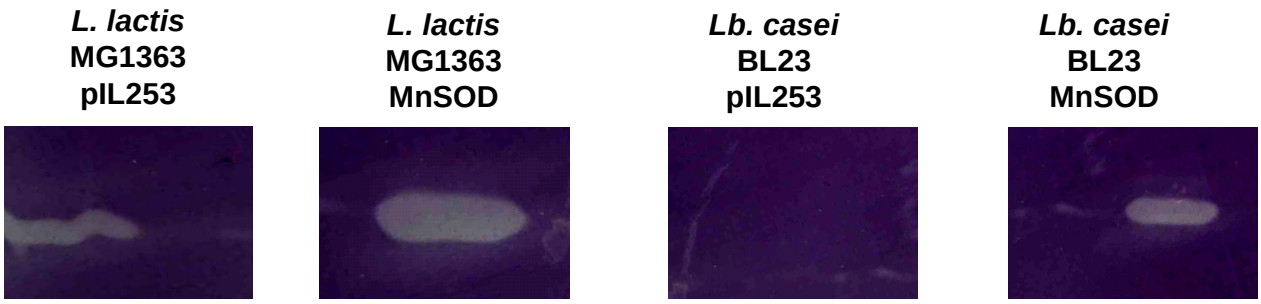


Fig. 2. Antioxidative effect of *Lb. casei* MnSOD and *Lb. casei* MnKat strains using two *in vitro* PMA-induced oxidative stress cellular models. Either POM cells (A) or splenocytes (B) were incubated with *Lb. casei* pIL253, *Lb. casei* MnSOD or *Lb. casei* MnKat in presence of DCFH-DA and PMA. Control groups used: i) cells incubated with DFCH-DA alone (group DCFH-DA, no stress induction) and ii) cells incubated with DCFH-DA and PMA (PMA group, stress induction). DCFH-DA is cleaved in DCFH by cellular esterase and then oxidized by ROS in DCF, which is a fluorescent molecule. Fluorescent DCF was measured using FACS analysis. Significant differences ($p < 0.05$) were established using student's test with JMP^{TM} software.

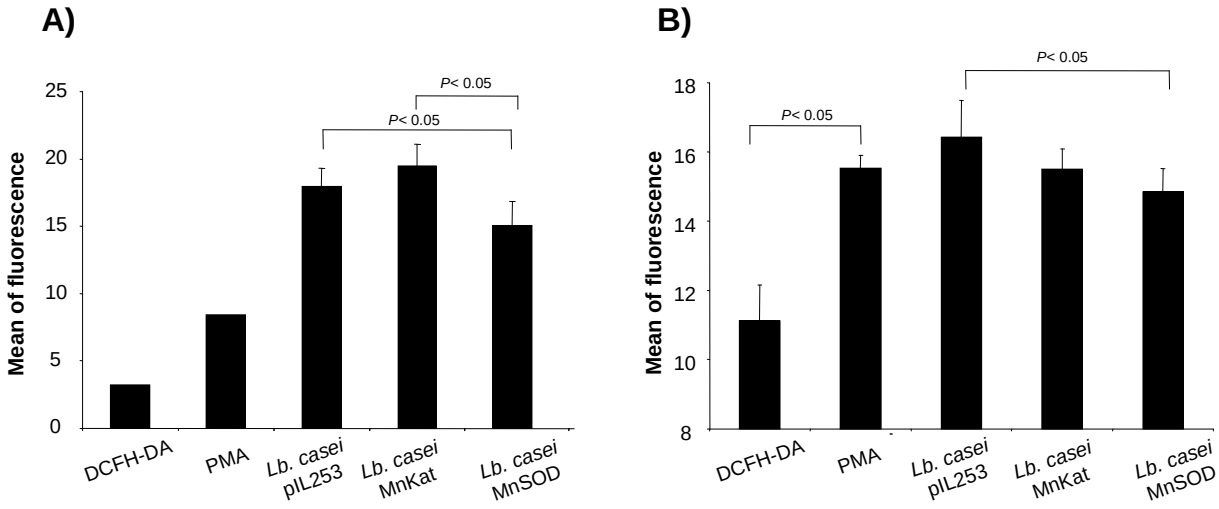


Fig. 3. Experimental protocol to induce colitis in BALB/c mice. Phase 1 corresponds to acclimatization whereas phase 2 and phase 3 correspond to intragastric administration and colitis induction by DSS 3% addition in drinking water, respectively. Groups (n=10) used as control were treated with PBS and no DSS (A: PBS group, no inflammation control) or DSS 3% (B: DSS group, inflammation control). Three bacterial treatments were evaluated corresponding to the groups treated *Lb.casei* pIL253 (C); *Lb.casei* MnSOD alone (D) or in combination with *Lb. casei* MnKat (E).

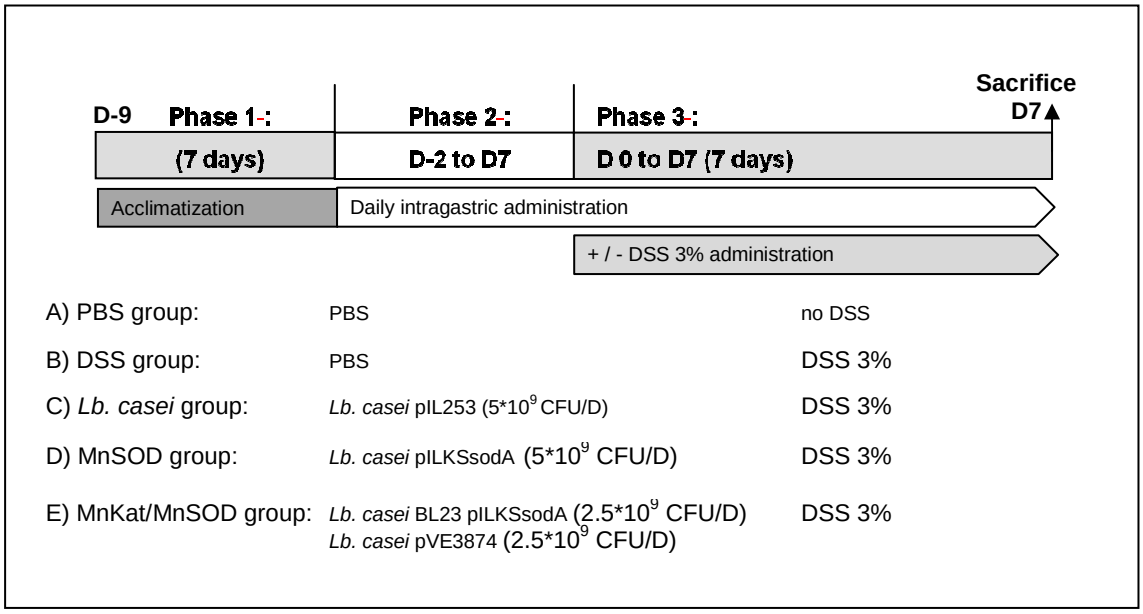


Fig. 4. Representative hematoxylin and eosin stained sections from colon of BALB/c mice where a colitis was induced by DSS (3%) and treated with different *Lb. casei* BL23 strains. A, normal colon from PBS group; B, inflammatory section from DSS group; C, colonic mucosa from *Lb. casei* pIL253 group; D, colonic section from *Lb. casei* MnSOD group and E, colonic mucosa from *Lb. casei* MnSOD/*Lb. casei* MnKat group.

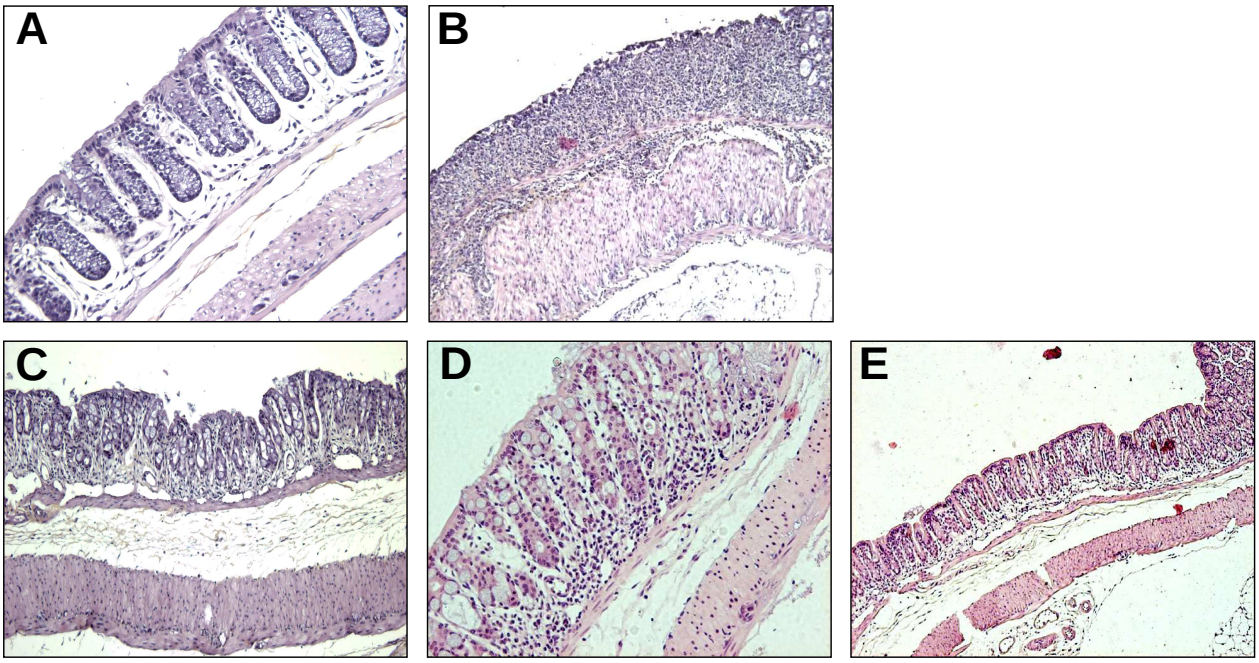
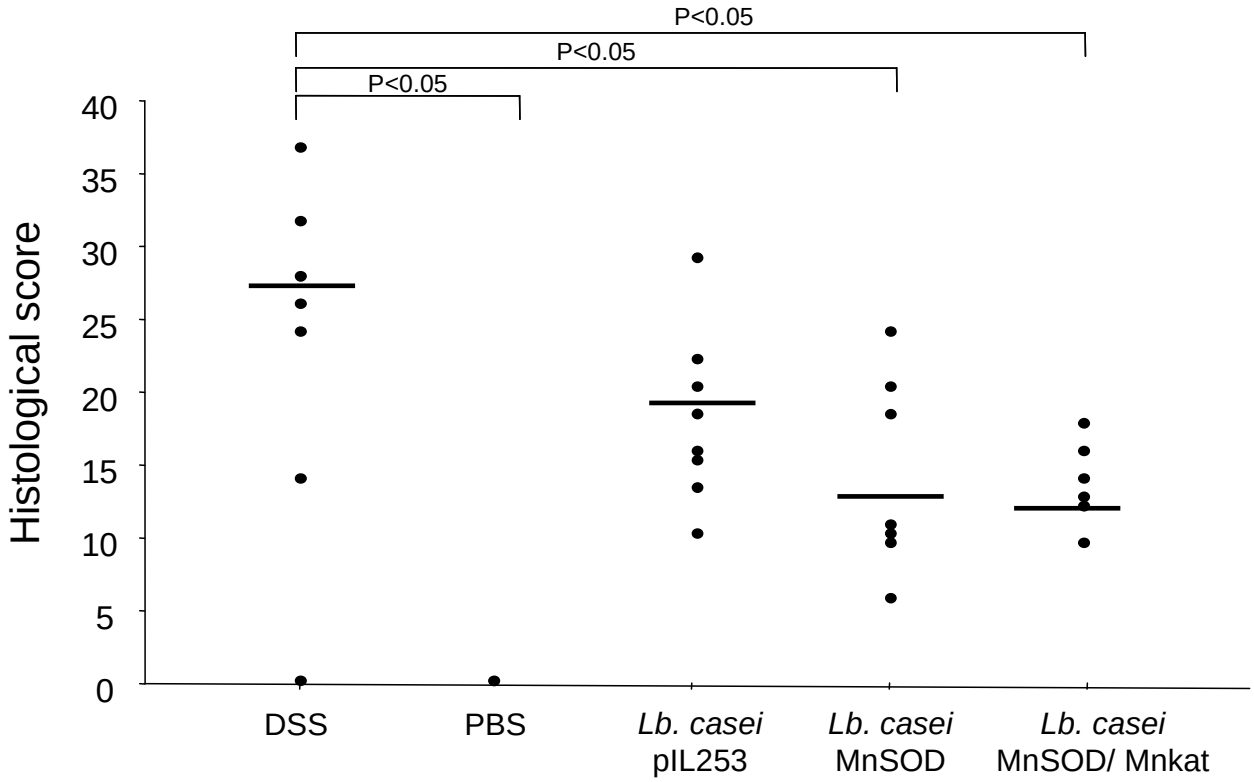


Fig. 5. Colonic histological damage score of BALB/c mice where a colitis was induced by DSS 3% and treated with *Lb. casei* strains. n=10 mice per group. Significant differences ($p < 0.05$) were established using Wilcoxon test.



2) Etude des effets anti-inflammatoires d'une bactérie commensale, *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165

- **Contexte de l'étude**

Les bactéries composant le microbiote intestinal peuvent jouer un rôle essentiel chez les patients atteints de MICI. On a en effet découvert l'existence d'une dysbiose entraînant ainsi la diminution des bactéries symbiotiques et à l'inverse l'augmentation des bactéries opportunistes dans des biopsies de patients.

F. prausznitzii A2-165 est un bacille Gram positif, anaérobie strict à bas GC faisant partie du groupe *Cl. leptum* (Duncan *et al*., 2002) . Il s'agit d'une bactérie commensale isolée du microbiote humain. Certaines études ont permis d'observer que la proportion de ce groupe diminuait dans le microbiote intestinal chez des patients atteints de la MC en comparaison avec des sujets sains. Ces observations ont amené l'hypothèse que le groupe *Cl. leptum* pouvait jouer un rôle dans le développement de la maladie (Sokol *et al*., 2006).

- **Objectifs et stratégies**

Afin d'analyser les effets anti-inflammatoires de *F. prausnitzii*, plusieurs expériences ont été menées alliant les études *in vitro, in vivo* chez l'animal mais également des observations cliniques chez l'homme.

Dans un premier temps, le rôle de *F. prausnitzii* a été mis en évidence chez des patients atteints de MICI. Puis, les effets anti-inflammatoires de la souche ont clairement été démontrés dans les modèles d'études *in vivo* utilisant une colite sévère induite par du TNBS sur le modèle murin. Enfin, nous avons tenté d'élucider les mécanismes d'action de cette bactérie par l'analyse des effets de *F. prausnitzii* vivante ou morte, de son surnageant, son ADN, ses membranes ou encore son cytoplasme. Pour ce faire, divers modèles d'études *in vitro* ont été nécessaires, permettant ainsi l'analyse des effets de notre souche et de ses composants sur la sécrétion de cytokines pro/anti-inflammatoires, ses effets sur la dysbiose du microbiote observée lors d'une inflammation ou encore ses effets anti-bactériens.

- **Résultats**

Les resultats sont décrits dans l'article "*Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients" p°175.

Le travail sur *F. prausznitzii* A2-165 au laboratoire a été initié et développé par H. Sokol (gastroentérologue; CHU St Antoine, Paris) dans le cadre de son Master M2 puis de sa thèse. En raison de la convergence de nos sujets et de l'analogie des stratégies mises en place, j'ai travaillé en étroite collaboration avec H. Sokol pendant ma première année de thèse où j'ai plus particulièrement participé aux expériences menées *in vivo*. Cette collaboration a permis d'aboutir à l'écriture d'un article paru dans Proceedings of the National Academy of Science dans lequel je suis deuxième auteur.

- **Conclusions et perspectives**

Les études cliniques ont dans un premier temps mis en évidence la diminution de *F. prausnitzii* dans l'iléon des patients qui rechutaient après une opération, en comparaison avec les patients en rémission ayant subi la même opération. Ces résultats nous ont amené à penser que cette espèce joue probablement un rôle dans la protection de l'intestin vis-à-vis de l'inflammation. Les études *in vivo* menées au laboratoire, ont montré que seule la souche vivante et son surnageant permettaient de protéger les souris contre une inflammation induite par du TNBS, en agissant notamment sur la modification de la sécrétion de cytokines pro/anti-inflammatoires (augmentation de l'IL-10 et diminution de l'IL-12). Les études *in vitro* réalisées ont confirmé ses données en montrant un effet sur la régulation de ses cytokines *via* l'utilisation de divers modèles cellulaire (PBMC, HT-29, Caco-2). De même, un effet du surnageant de *F. prausnitzii* a été démontré sur l'inhibition de la voie NF-κB, les observations ont été réalisées sur la lignée intestinale Caco-2 *via* l'analyse de l'activité de l'alkaline phosphatase dont la sécrétion est dépendante de la stimulation de NF-κB.

Bien qu'aucun effet antibactérien de la souche n'ait été démontré, on note tout de même un rétablissement de la dysbiose sur les souris enflammées au TNBS, ayant reçu en traitement préventif la souche ou son surnageant.

Pour conclure, ces travaux suggèrent que *F. prausnitzii* joue un rôle dans la prévention de récidives de l'inflammation chez des patients atteints de MICI en rémission post-opératoire. Il

est également probable que l'action anti-inflammatoire de la bactérie soit due à la sécrétion d'une molécule qui agit sur la voie NF-κB, bloquant la voie Th1 et limitant ainsi l'induction d'une inflammation.

- **Article : *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients**

SEE COMMENTARY

Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients

Harry Sokol*†, Bénédicte Pigneur†‡, Laurie Watterlot*, Omar Lakhdari*, Luis G. Bermúdez-Humarán*, Jean-Jacques Gratadoux*, Sébastien Blugeon*, Chantal Bridonneau*, Jean-Pierre Furet*, Gérard Corthier*, Corinne Grangette§, Nadia Vasquez¶, Philippe Pochart¶, Germain Trugnan‡, Ginette Thomas‡, Hervé M. Blottière*, Joël Doré*, Philippe Marteau‖, Philippe Seksik‡**††, and Philippe Langella*,**††

*Unité Ecologie et Physiologie du Système Digestif, Institut National de la Recherche Agronomique U910, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France; †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U538, Pierre and Marie Curie University, 75571 Paris, France; §Laboratoire des Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses, Institut Pasteur de Lille, Rue du Professeur Calmette, 59000 Lille, France; ¶Laboratoire de Biologie EA 3199, Conservatoire National des Arts et Métiers, 75003 Paris, France; and ‖Gastroenterology Unit, Lariboisière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 75010 Paris, France

Edited by Todd R. Klaenhammer, North Carolina State University, Raleigh, NC, and approved September 8 2008 (received for review May 22, 2008)

A decrease in the abundance and biodiversity of intestinal bacteria within the dominant phylum Firmicutes has been observed repeatedly in Crohn disease (CD) patients. In this study, we determined the composition of the mucosa-associated microbiota of CD patients at the time of surgical resection and 6 months later using FISH analysis. We found that a reduction of a major member of Firmicutes, *Faecalibacterium prausnitzii*, is associated with a higher risk of postoperative recurrence of ileal CD. A lower proportion of *F. prausnitzii* on resected ileal Crohn mucosa also was associated with endoscopic recurrence at 6 months. To evaluate the immunomodulatory properties of *F. prausnitzii* we analyzed the anti-inflammatory effects of *F. prausnitzii* in both *in vitro* (cellular models) and *in vivo* [2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)-induced] colitis in mice. In Caco-2 cells transfected with a reporter gene for NF-κB activity, *F. prausnitzii* had no effect on IL-1β-induced NF-κB activity, whereas the supernatant abolished it. *In vitro* peripheral blood mononuclear cell stimulation by *F. prausnitzii* led to significantly lower IL-12 and IFN-γ production levels and higher secretion of IL-10. Oral administration of either live *F. prausnitzii* or its supernatant markedly reduced the severity of TNBS colitis and tended to correct the dysbiosis associated with TNBS colitis, as demonstrated by real-time quantitative PCR (qPCR) analysis. *F. prausnitzii* exhibits anti-inflammatory effects on cellular and TNBS colitis models, partly due to secreted metabolites able to block NF-κB activation and IL-8 production. These results suggest that counterbalancing dysbiosis using *F. prausnitzii* as a probiotic is a promising strategy in CD treatment.

IBD | microbiota | probiotic

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of disorders characterized by a chronic and relapsing inflammation of the gastrointestinal tract frequent in Western countries (1). The two most common forms of IBD are Crohn disease (CD) and ulcerative colitis. The pathogenesis involves an inappropriate and ongoing activation of the mucosal immune system driven by the presence of the intestinal microbiota in a genetically predisposed patient. In CD in particular, the intestinal microbiota is strongly suspected to play a role in initiating and triggering the immune system, leading to characteristic inflammation (2). Diversion of the fecal stream prevents postoperative recurrence of ileal CD (3). Two antagonistic strategies were proposed to define the role of microorganisms in IBD: "the candidate microorganism strategy" (4) and the "global description strategy" (5–7). We previously described the global specificities of the fecal microbiota in CD (6, 8). Using a metagenomic approach, we revealed a global decrease in the biodiversity of the fecal microbiota in CD (8). This was essentially due to a markedly reduced diversity of Firmicutes, and in particular of the *Clostridium leptum* phylogenetic group. Moreover, analysis by FISH combined with flow cytometry showed a significant quantitative reduction in the *C. leptum* group in CD patients compared with healthy subjects (6, 8). Using different molecular methods, other studies reported that *Faecalibacterium prausnitzii* was particularly depleted in IBD patients' ileocolonic mucosa-associated microbiota (MAM) (9, 10).

In this study, we first analyzed the composition of the ileal MAM of CD patients at the time of surgical resection for active disease and 6 months later by FISH. We observed that the proportion of Firmicutes, and in particular of *F. prausnitzii*, which is the major bacterium of the *C. leptum* group, was low in patients that exhibited endoscopic recurrence 6 months after surgery. We hypothesized that counterbalancing dysbiosis using this deficient commensal bacterium as a probiotic in CD could be beneficial. Then, we evaluated the potential role of *F. prausnitzii* on intestinal inflammation using cellular and animal models.

Results

A Lower Proportion of *F. prausnitzii* on Resected Ileal Crohn Mucosa Is Associated with Endoscopic Recurrence. Previously, we demonstrated that administration of *Lactobacillus johnsonii* LA1 is ineffective for prophylaxis of postoperative endoscopic recurrence in CD (11). We did not observe any significant difference in the composition of the MAM between *L. johnsonii* LA1 and placebo groups at the time of surgery or 6 months after in surgical and biopsy samples from 21 human volunteers (data not shown). Focusing on endoscopic recurrence at 6 months (Rutgeerts score ≥2 for 13 patients, LA1 $n = 6$ and placebo $n = 7$), we observed: (*i*) a significantly lower proportion of *F. prausnitzii* at the time of surgery, consistently associated with endoscopic relapse, and (*ii*) a lower proportion of Firmicutes (i.e., *C. coccoides* and *F. prausnitzii*) 6 months after surgery in CD patients with endoscopic recurrence when compared with CD patients who were still in remission [Fig. 1, supporting information (SI) Table S1, and *SI Materials and*

Author contributions: H.S., L.W., J.D., P.M., P.S., and P.L. designed research; H.S., B.P., O.L., L.G.B.-H., J.-J.G., S.B., C.B., J.-P.F., C.G., and G. Thomas performed research; O.L., J.-P.F., and H.M.B. contributed new reagents/analytic tools; H.S., G.C., N.V., P.P., G. Trugnan, G. Thomas, H.M.B., and P.M. analyzed data; and H.S., P.S., and P.L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

See Commentary on page 16413.

†H.S. and B.P. contributed equally to this work.

**P.S. and P.L. contributed equally to this work.

††To whom correspondence may be addressed. E-mail: philippe.seksik@sat.aphp.fr or philippe.langella@jouy.inra.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0804812105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

MICROBIOLOGY

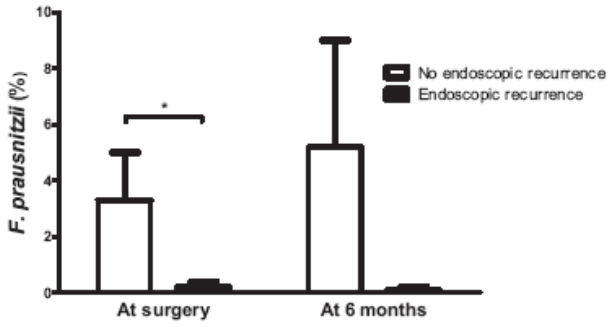


Fig. 1. *F. prausnitzii* proportions in the ileal MAM using FISH at the time of surgery and at 6 months according to the endoscopic recurrence status. *, Significant difference, $P = 0.03$.

Methods]. Based on these observations, we hypothesized that remission might be associated with the presence of *F. prausnitzii*, and probably with its anti-inflammatory effects.

***F. prausnitzii* Exerts Anti-inflammatory Effects in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).** Because the cytokine profile released by PBMCs has been previously shown to correlate the *in vitro* and *in vivo* immunomodulation potential of different bacteria (29), we analyzed the capacities of *F. prausnitzii* to induce cytokine production in PBMCs (*SI Materials and Methods*). In addition, the immunostimulation by four other strains having well-documented *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties (*Lactobacillus salivarius* Ls33) (12), or lacking any anti-inflammatory activities (*L. acidophilus* NCFM, *Lactococcus lactis* MG1363, and *Escherichia coli* TG1) were also tested (Fig. 2). Interestingly, *F. prausnitzii* and *L. salivarius* Ls33 were the weakest inducers of proinflammatory/Th1 cytokines (e.g., IL-12 and IFN-γ) and the highest inducers of anti-inflammatory IL-10 compared with the other tested strains. The ratio of IL-10 to IL-12, frequently used to distinguish between strains exhibiting a proinflammatory (low ratio) vs. an anti-inflammatory (high ratio) profile, reveals that *F. prausnitzii* exhibit the highest anti-inflammatory profile (Fig. 2*D*).

***F. prausnitzii* Supernatant Reduces IL-8 Secretion by Caco-2 Cells.** We examined the effects of UV-killed *F. prausnitzii*, bacterial fractions, supernatants, or sterile medium on IL-8 secretion in Caco-2 cells, with or without IL-1β stimulation (*SI Materials and Methods* and Fig. 3*A*). Either UV-killed *F. prausnitzii*, membrane extracts, or cytoplasmic extracts, but not DNA or sterile medium, induce low levels of IL-8 secretion. UV-killed *F. prausnitzii*, bacterial fractions, and sterile medium did not inhibit IL-8 secretion induced by IL-1β, compared with negative control. In contrast, supernatant from *F. prausnitzii* cultures significantly reduces IL-8 secretion induced by IL-1β.

***F. prausnitzii* Supernatant Abolishes NF-κB Activation in Caco-2 Reporter Cell Lines.** To further explore the immunomodulatory properties of *F. prausnitzii*, we tested the effects of this bacterium and its supernatant on NF-κB activation using a Caco-2 reporter cell line (*SI Materials and Methods*). In Caco-2 cells, *F. prausnitzii* stimulates an NF-κB-dependent secreted alkaline-phosphatase (SEAP) production (Fig. 3*B*), whereas the supernatant decreases the basal NF-κB activity. After stimulation with IL-1β, NF-κB activity increases significantly. No significant effect on IL-1β stimulation was observed with UV-killed bacteria, whereas the *F. prausnitzii* supernatant strongly inhibits NF-κB activation by IL-1β in Caco-2 cells.

Because *F. prausnitzii* produces high amounts of butyrate, which has well known anti-inflammatory effects (13), we evaluated the effect of butyrate in Caco-2 reporter cell lines at the concentration present in the *F. prausnitzii* supernatant (i.e., 40 mM). Butyrate did not reproduce the supernatant inhibitory effect after IL-1β stimulation, but in contrast strongly increased NF-κB activation (data not shown).

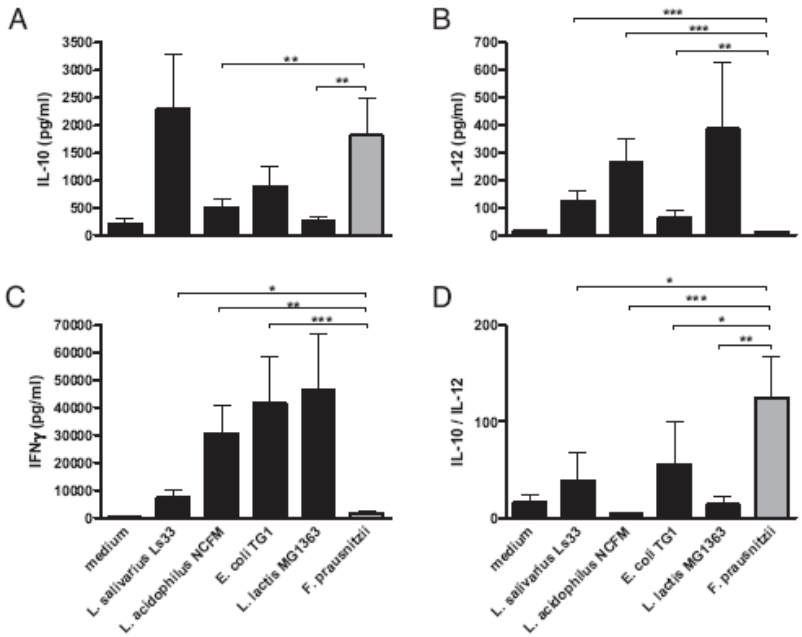


Fig. 2. IL-10 (*A*), IL-12 (*B*), and IFN-γ (*C*) response of human PBMCs of six distinct individual donors to stimulation with RPMI medium and five bacterial strains. The values are expressed as the mean ± SEM in pg/ml for cytokines and in percentages for IL-10/IL-12 ratio (*D*). Different asterisks (*) indicate significant differences (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.003$).

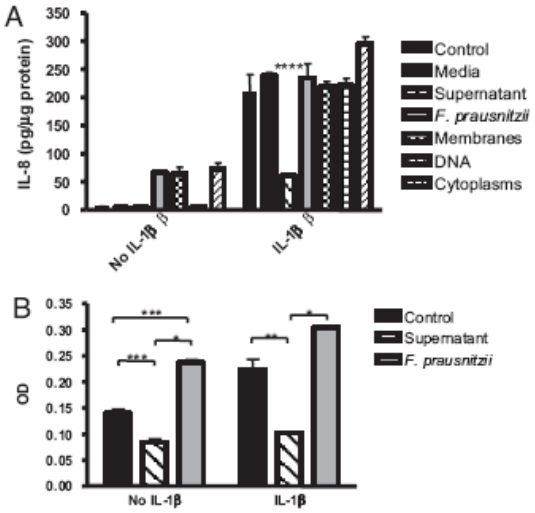


Fig. 3. *F. prausnitzii* supernatant exerts antiinflammatory effects on Caco-2 cells. (*A*) Modulation of IL-1β-induced IL-8 secretion by Caco-2 cells in contact with *F. prausnitzii*, its component, or its supernatant. Cells were stimulated or not with IL-1β at 15 ng/ml. IL-8 secretion is expressed as picograms per micgrogram of proteins. The values are expressed as the mean ± SEM in pg/µg of proteins. (*B*) Effects of *F. prausnitzii* on Caco2 cells stably transfected with an NF-κB SEAP reporter gene with or without stimulation with IL-1β. SEAP activity is expressed as optical density (OD). Different asterisks (*) indicate significant differences (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.003$; ****, $P < 0.001$).

F. prausnitzii Supernatant Did Not Display _In Vitro_ Antibacterial Effect. We investigated antibacterial properties of *F. prausnitzii* supernatant. Using two different *in vitro* techniques (critical dilutions of Mayr-Harting *et al.*, ref. 14; and bacteriocin activity assay, ref. 15), we did not reveal any antibacterial effect on several anaerobic and aerobic bacterial species (see description in *Materials and Methods*).

Severity of TNBS-Induced Colitis in Mice Is Reduced by _F. prausnitzii_ and Its Supernatant. We further explored the relevance of these observations *in vivo* by testing the ability of *F. prausnitzii*, its DNA and membrane fractions, and its supernatant to prevent acute colitis induced by TNBS in BALB/c mice (*SI Materials and Methods* and Fig. 4). A severe colitis was observed in the colitis control group. No improvement in colitis severity was observed with either UV-killed *F. prausnitzii*, its DNA, or its membrane (data not shown). In contrast, daily intragastric administration of living *F. prausnitzii* (5×10^9 cfu) or its supernatant resulted in a marked attenuation of colitis with reduced weight loss, partial colon length normalization, and improvement of Wallace and Ameho scores. No significant protective effect was observed in mice receiving sterile culture medium.

***F. prausnitzii* and Its Supernatant Induce an Increased Secretion of IL-10 and a Decreased Secretion of TNF-α and IL-12 in TNBS-Induced Colitis in Mice.** Forty-eight hours after TNBS instillation, colonic proinflammatory TNF-α and IL-12 cytokines and anti-inflammatory IL-10 were quantified by ELISA (*SI Materials and Methods* and Fig. 5). Compared with the no-colitis control group, TNF-α and IL-12 levels were increased, whereas IL-10 levels were barely modified. In the two TNBS groups treated with either *F. prausnitzii* or its supernatant, the secretion of TNF-α and IL-12 was significantly lower than in the colitis control group. Interestingly, IL-10 secretion was induced in the colon of mice treated with *F. prausnitzii* or its supernatant.

***F. prausnitzii* and Its Supernatant Tend to Counterbalance the TNBS-Induced Dysbiosis in Colitic Mice.** To validate our initial hypothesis, we determined the composition of the fecal microbiota of mice from the colitis (TNBS-treated) and no-colitis control, the *F. prausnitzii*-treated, and the supernatant-treated groups by real-time qPCR (*SI Materials and Methods*, Table S2, and Fig. 6). A higher

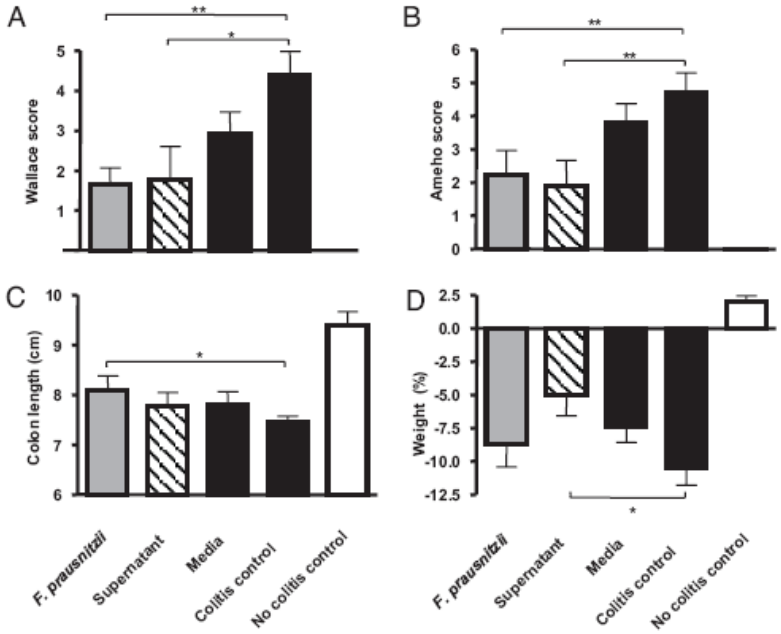


Fig. 4. Effects of intragastric administration of *F. prausnitzii* and its supernatant on TNBS-induced colitis in BALB/c mice considering (*A*) Wallace macroscopic score, (*B*) Ameho histologic score, (*C*) colon length, and (*D*) weight. Each group included 9 or 10 mice. The values are expressed as the mean ± SEM. Different asterisks (*) indicate significant differences (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

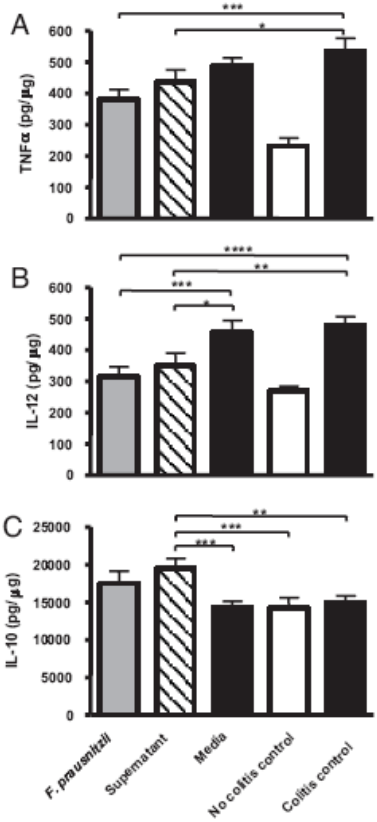


Fig. 5. Quantification using ELISA of TNF-α (*A*), IL-12 (*B*), and IL-10 (*C*) in colons obtained 48 h after TNBS colitis induction. The values are expressed in pg/μg of total proteins as the mean ± SEM. Different asterisks (*) indicate significant differences (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.003$; ****, $P < 0.001$).

concentration of total bacteria, bacteria from the *C. leptum* group, the *Bacteroides* group, and bacteria from the *C. coccoides* group was measured in the fecal microbiota of the colitis control mice compared with the no-colitis control mice. No difference was observed concerning the *Lactobacillus* group and *E. coli* species. *F. prausnitzii* was the only species diminished in colitis control mice. Treatment with either *F. prausnitzii* or its supernatant tended to counterbalance the dysbiosis observed in colitis control mice for all bacteria: *C. leptum*, *C. coccoides*, *Bacteroides*, and *F. prausnitzii* (Fig. 6). Strikingly, *F. prausnitzii* occurrence was nearly normalized in the *F. prausnitzii*-treated group.

***F. prausnitzii* and Its Supernatant Can Act by a Gut-Independent Route.** To investigate whether *F. prausnitzii* or its supernatant could be active by a gut-independent pathway, we tested i.p. injection in a TNBS-induced colitis model. The survival rates 20 days after colitis induction were 100% and 10% in the no-colitis and colitis control groups, respectively (Fig. 7). In a third control group treated with dexamethasone, the survival rate was 40% at 20 days. In the groups treated with live *F. prausnitzii* or the supernatant, the mortality rate was dramatically decreased. The group treated by live *F. prausnitzii* had a significantly better survival curve than the colitis control group ($P = 0.039$), with a survival rate of 50% at 20 days, close to the rate observed in the dexamethasone group. The mortality rate in the group treated with the culture supernatant was reduced to 0 (versus positive control, $P < 10^{-4}$; vs. dexamethasone group, $P = 0.004$). Interestingly, this strong anti-inflammatory effect was not

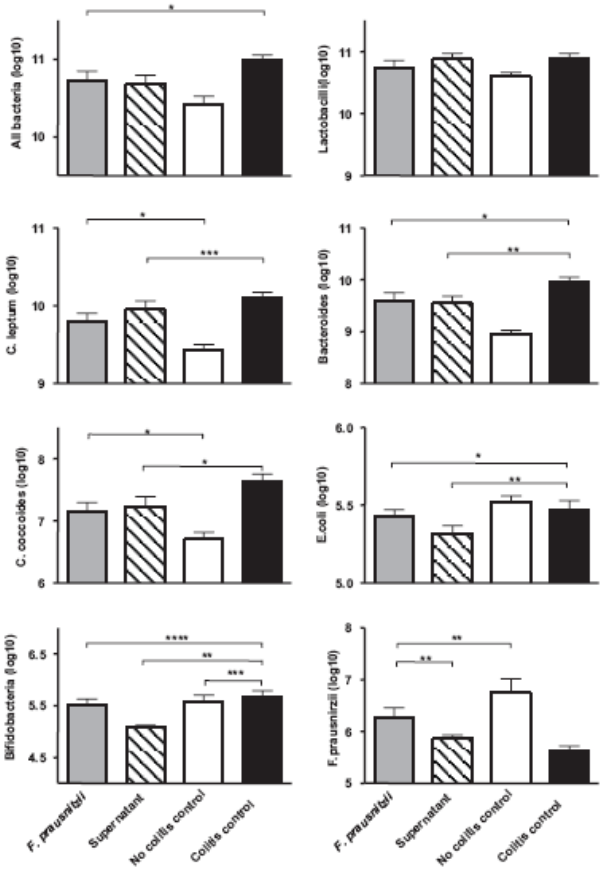


Fig. 6. Quantification using real-time qPCR of dominant and subdominant bacteria in the fecal microbiota of mice 48 h after TNBS induction of colitis. Noncolitis control group received PBS intragastrically and 0.9% NaCl/ethanol (50:50 vol/vol) intrarectally. The values are expressed as the mean of Log_{10} bacteria per gram of stool ± SEM. Different asterisks (*) indicate significant differences (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.003$; ****, $P < 0.001$).

due to butyrate presence, as the group of mice treated with butyrate (at the same concentration as supernatant) had a mortality rate similar to that in the colitis control group.

Discussion

In this study, we showed that a low proportion of *F. prausnitzii* on resected ileal Crohn mucosa is associated with endoscopic recur-

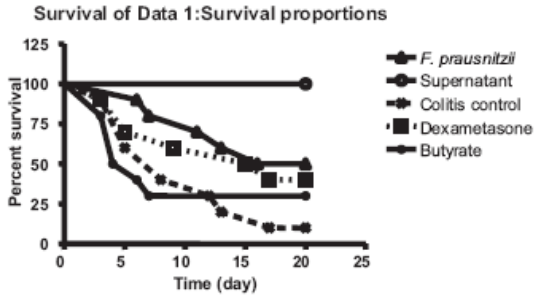


Fig. 7. Protective effects of i.p. administration of *F. prausnitzii* and its supernatant on mice after TNBS challenge. Each group included 10 mice. Statistical analysis was performed using the log rank test.

rence at 6 months. Moreover, this bacterium, deficient in CD patients' microbiota, has anti-inflammatory effects *in vitro* as well as *in vivo*. On Caco-2 cells, secreted metabolites blocked NF-κB activation and IL-8 secretion. Moreover, on PBMCs, *F. prausnitzii* induced very low levels of IL-12 and IFN-γ, whereas high levels of IL-10 were obtained compared with other bacterial strains tested. Considering the IL10/IL12 ratio measured on PBMCs, *F. prausnitzii* displays the most anti-inflammatory properties. These *in vitro* effects were confirmed *in vivo* on TNBS-induced colitis.

It is now well established that microbial components of the resident microbiota can regulate gut inflammation (16). Moreover, some bacterial strains, like *Bacteroides thetaiotaomicron*, have been particularly studied and their participation in the gut immune homeostasis elucidated (17). In parallel, the specificities of the gut microbiota composition in IBD patients have been assessed using molecular methods. Nevertheless, this recent knowledge has not yet been used to find new anti-inflammatory bacteria within the normal gut microbiota, to date.

An original and rational process led us to select *F. prausnitzii* as a candidate anti-inflammatory bacterium. Comparing any gut microbiota of healthy subjects and of CD patients, we observed that the *C. leptum* group within the dominant Firmicutes phylum was defective in CD patients' microbiota (6, 8). This deficiency was quantitative and qualitative, as the biodiversity of the *C. leptum* was restricted. *F. prausnitzii* is one of the major members of the *C. leptum* group (18, 19) and one of the most prevalent bacteria within the human gut. In the present study, we showed that a low proportion of *F. prausnitzii* in the ileal MAM of CD patients at the time of a surgical resection for active disease was a risk factor for endoscopic recurrence 6 months later. Taken together, all these results suggested that *F. prausnitzii* could be crucial to the gut homeostasis and could have anti-inflammatory properties.

F. prausnitzii and its components were then tested on Caco-2 cells stimulated with IL-1β. After stimulation by IL-1β, IL-8 secretion was not modified by *F. prausnitzii* and reduced by its supernatant. To better understand the mechanisms involved in this effect, we tested the bacterium components on Caco-2 cells stably expressing a reporter gene for NF-κB. We observed that *F. prausnitzii* increased the IL-1β-induced NF-κB activity, whereas the supernatant abolished it. It is noticeable, that *F. prausnitzii* DNA did not exhibit any inhibitor effect on either IL-8 secretion or NF-κB activation. Moreover, we showed that this blocking effect on NF-κB activation was not due to butyrate.

Besides, it is questionable whether the anti-inflammatory effect of the supernatant is shared by an *F. prausnitzii*-secreted metabolite(s) or due to an *F. prausnitzii*-induced change in product(s) of the culture medium. The fact that living *F. prausnitzii* given without supernatant exerts an anti-inflammatory effect in the *in vivo* experiments favors the hypothesis of secreted metabolite(s)-induced effect. Identification of the active molecule(s) involved in this protective effect is needed to specify this point.

Our results favor a secreted metabolite, which could be involved in inflammatory pathway control. Several targets can be evoked from the lumen to immune cells in the *lamina propria*, and we first speculated on an antimicrobial peptide (bacteriocin) able to modify the gut barrier. However, our *in vitro* tests did not reveal any antibacterial effect on several anaerobic and aerobic bacteria species. Antibacterial mode of action also could be mediated by stimulation of defensin secretion. In fact, it has been shown that a defect in HD-5 and HD-6 α-defensin secretion by Paneth cells (specialized epithelial cells from ileum) plays a crucial role in ileal CD and could be linked to NOD2 frameshift mutation (20, 21). The clinical part of our study focused on ileal CD patients requiring surgical resection. Thus, the dysbiosis in *F. prausnitzii* appears attractive regarding the α-defensin deficiency concept. As some probiotics have been shown to induce defensin secretion (22), a step further will be to investigate the ability of *F. prausnitzii* to induce such a secretion. Beside a gut barrier effect, our results suggest that a diffusible molecule (modulin) could block NF-κB activation. More precisely, our data showed that *F. prausnitzii* supernatant acts as a regulator of the NF-κB induction after stimulation by IL-1β. Nevertheless, the mechanism is probably more complex, because NF-κB activation has been shown to play a crucial role in gut homeostasis (23). Indeed, *F. prausnitzii* itself without its supernatant exerts NF-κB induction effect on Caco-2 cells (Fig. 3*B*). However, our data did not support that this mechanism is Toll-like receptor-dependent, because *in vivo* and *in vitro* experiments testing different bacteria components (DNA, membranes, cytosol) did not show any anti-inflammatory activity. Finally, *F. prausnitzii* could drive the immune responses toward Th1 pathway inhibition.

To evaluate the potential immunomodulatory capacity of *F. prausnitzii*, we measured the cytokine response of human PBMCs stimulated by the bacterium. *F. prausnitzii* had an anti-inflammatory profile because it induced very low secretion levels of IL-12 and IFN-γ and high secretion levels of IL-10. Moreover, *F. prausnitzii* has a higher IL10/IL12 ratio than the probiotic *L. salivarius* Ls33 strain known to have anti-inflammatory effects.

To confirm *in vivo* the anti-inflammatory effects observed *in vitro*, we tested *F. prausnitzii* in a murine TNBS-induced colitis model. *F. prausnitzii* and its supernatant had a protective effect in this colitis model, on macroscopic and histologic criteria as well as on colonic cytokine secretion profile. Mice treated with either *F. prausnitzii* or its supernatant had a reduced IL-12 and an elevated IL-10 colonic concentration compared with the colitis control group. Interestingly, this effect on cytokine profile is close to the one observed *in vitro* on PBMCs.

To go back to our initial hypothesis, we analyzed the composition of the mouse fecal microbiota by culture-independent methods. We observed that the dysbiosis associated with TNBS-induced colitis was partially counterbalanced by *F. prausnitzii* or its supernatant administration.

Several authors reported that probiotics could act by systemic routes of administration (24–26). To investigate whether *F. prausnitzii* can also be active by a gut-independent pathway, we tested it i.p. on a TNBS-induced colitis model. Systemic delivery of *F. prausnitzii* and, above all, of its supernatant significantly improved the survival curve related to TNBS-induced colitis. Here again, this effect was not related to butyrate presence.

In summary, a rational process led us to select *F. prausnitzii* as an anti-inflammatory bacterial candidate. Analysis revealed that *F. prausnitzii* exhibited anti-inflammatory effects, partly due to secreted metabolites blocking NF-κB activation and IL-8 secretion. Moreover, *in vivo* effects were associated with a decrease in proinflammatory colonic cytokine synthesis and with the induction of anti-inflammatory cytokine secretion. Counterbalancing dysbiosis using the commensal bacterium *F. prausnitzii* as a candidate probiotic agent appears to be a promising strategy in CD treatment. Nevertheless, clinical studies should establish diagnostic tools to define the best population of patients for this probiotic species, and especially whether the clinical benefit is more pronounced in patients with low levels of endogenous Firmicutes.

Materials and Methods

Patients. The present study was part of a double-blind controlled trial that compared the efficiency of the probiotic *L. johnsonii* LA1 strain and a placebo to decrease endoscopic recurrence after curative surgery for CD (11). Although the whole human trial included 98 patients, the present study, which assessed the MAM, included only a subset of these patients.

Tissues, Histological Examination, FISH, and Quantification of Bacteria. Surgical samples and mucosal biopsy samples were processed directly in the operating room as previously described (27).

Bacterial Culture. *F. prausnitzii* A2–165 (DSM 17677), isolated from human fecal stool, was grown at 37°C in LYHBHI medium [Brain–heart infusion medium supplemented with 0.5% yeast extract (Difco) and 5 mg/liter hemin] supple-

mented with cellobiose (1 mg/ml; Sigma–Aldrich), maltose (1 mg/ml; Sigma), and cysteine (0.5 mg/ml; Sigma) in an anaerobic chamber.

Butyrate Quantification. Butyrate was quantified in supernatant and culture medium using a gas–liquid chromatograph (Autosystem XL; Perkin–Elmer) as described (28).

Antibacterial Assay. Antibacterial effect of *F. prausnitzii* supernatant was investigated *in vitro* using two different techniques: the critical dilutions of Mayr-Harting (14) and the bacteriocin activity assay as described (15). This antibacterial effect was tested on six bacterial species: three aerobic bacteria (*E. coli* Nissle 1917, *E. coli* DH10B, and *Listeria monocytogenes* 11765), one facultative anaerobic bacteria (*Lactococcus* subsp *cremoris* MG1363), and two obligate anaerobic bacteria (*Clostridium perfringens* ATCC13124 and *Bifidobacterium infantis* DSM20088/ATCC15697). Antibiotic rifampicine and colistine were used as positive controls, whereas LYHBHI medium was used as negative control.

PBMC Isolation and Stimulation. PBMCs were isolated from the peripheral blood of healthy donors as described (29).

TNBS-Induced Colitis. After acclimatization, bacterial suspensions (10^9-10^{10} cfu in 500 μl), bacterial supernatant, or control medium was administered to mice daily by intragastric gavage from day 5 before to day 1 after induction of colitis. For colitis induction, mice were anesthetized with isofluran gas. TNBS (Sigma–Aldrich) was dissolved in 0.9% NaCl/ethanol (50:50 vol/vol), and 50 μl solution (at a dose of 100 mg/kg body weight) was administered intrarectally (using a 3.5 French catheter; Solomon Scientific), and the mice then were kept in a vertical position for 30 seconds. No-colitis control mice received PBS intragastrically and 0.9% NaCl/ethanol (50:50 vol/vol) intrarectally (30). Colitis control mice received PBS intragastrically and received TNBS intrarectally. Treated mice received bacteria (or bacterial components) intragastrically and TNBS intrarectally. Inflammation was monitored 48 h after TNBS administration. Mice were weighed before TNBS administration and at killing by cervical dislocation.

The i.p. administration route experiments were performed using a protocol derived from the one previously described by Foligné *et al.* (24). The protective effect of a single i.p. injection of live microorganisms (10^9-10^{10} cfu in 200 μl), supernatant (200 μl), dexamethasone (10 mg/kg), or butyrate (40 mM) was evaluated. Bacteria or components were injected 1 h before TNBS-colitis induction. The mortality rate was monitored day by day for 20 days.

Inflammation Score Assessment of TNBS Colitis. The colon was removed, dissected free of fat and mesentery, carefully opened, and cleaned with PBS. Colon length was measured. Colonic damage and inflammation were assessed blindly according to the Wallace criteria (31).

Histological Assessment of TNBS-induced Colitis. For histological assessment, a colon sample located in the most inflamed area was fixed in 4% paraformaldehyde acid and embedded in paraffin. Four-micrometer sections were stained with hematoxylin/eosin and examined blindly according to the Ameho criteria (32) (Fig. S1).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Alexandra Gruss, Sylvie Rabot, and Maarten van de Guchte for critical reading of this manuscript. We also thank Anne Lavergne-Slove for histological support. We thank the Groupe d'Etude Thérapeutique des Affections Inflammatoires du Tube Digestif members who participated in the sample collections for the clinical study. H.S. received a grant from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris to achieve this work.

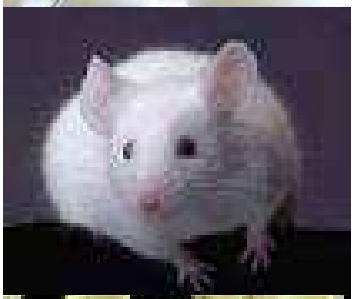
1. Loftus EV, Jr (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126:1504–1517.
2. Seksik P, *et al.* (2006) Review article: The role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 24:11–18.
3. Rutgeerts P, *et al.* (1991) Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 338:771–774.
4. Darfeuille-Michaud A, *et al.* (1998) Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115:1405–1413.
5. Sokol H, Lepage P, Seksik P, Dore J, Marteau P (2007) Molecular comparison of dominant microbiota associated with injured versus healthy mucosa in ulcerative colitis. *Gut* 56:152–154.
6. Sokol H, *et al.* (2006) Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:106–111.
7. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H (2005) Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 43:3380–3389.
8. Manichanh C, *et al.* (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55:205–211.
9. Frank DN, *et al.* (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13780–13785.
10. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, Acero D, Garcia-Gil LJ (2006) Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* 12:1136–1145.
11. Marteau P, *et al.* (2006) Ineffectiveness of Lactobacillus johnsonii LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: A randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut* 55:842–847.
12. Daniel C, *et al.* (2006) Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Appl Environ Microbiol* 72:5799–5805.
13. Segain JP, *et al.* (2000) Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: Implications for Crohn's disease. *Gut* 47:397–403.
14. Mayr-Harting A, Hedges AJ, Berkeley RCW (1972) Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiol* 7A:315–422.
15. Dabard J, *et al.* (2001) Ruminococcin A, a new lantibiotic produced by a Ruminococcus gnavus strain isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol* 67:4111–4118.
16. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229–241.
17. Kelly D, *et al.* (2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 5:104–112.
18. Barcenilla A, *et al.* (2000) Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 66:1654–1661.
19. Suau A, *et al.* (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 65:4799–4807.
20. Wehkamp J, *et al.* (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53:1658–1664.
21. Wehkamp J, *et al.* (2005) Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18129–18134.
22. Wehkamp J, *et al.* (2004) NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: A novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 72:5750–5758.
23. Nenci A, *et al.* (2007) Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 446:557–561.
24. Foligné B, Grangette C, Pot B (2005) Probiotics in IBD: Mucosal and systemic routes of administration may promote similar effects. *Gut* 54:727–728.
25. Rachmilewitz D, *et al.* (2004) Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126:520–528.
26. Sheil B, *et al.* (2004) Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* 53:694–700.
27. Vasquez N, *et al.* (2007) Patchy distribution of mucosal lesions in ileal Crohn's disease is not linked to differences in the dominant mucosa-associated bacteria: A study using fluorescence in situ hybridization and temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* 13:684–692.
28. Lan A, *et al.* (2007) Survival and metabolic activity of selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats. *Br J Nutr* 97:714–724.
29. Foligne B, *et al.* (2007) Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 13:236–243.
30. Foligne B, *et al.* (2006) Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: technical and microbiological aspects. *Dig Dis Sci* 51:390–400.
31. Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL (1989) Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 96:29–36.
32. Ameho CK, *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.













CHAPITRE 3 : DISCUSSIONS-PERSPECTIVES

I. PROBLEMATIQUE

Les contextes de ma thèse étaient d'étudier les relations qui s'établissent entre les bactéries commensales, probiotiques (naturelles ou recombinantes) avec l'hôte dans le contexte des pathologies inflammatoires intestinales du type MICI.

Les MICI sont caractérisées par une dérégulation du système immunitaire et principalement par la perte de l'homéostasie intestinale entraînant une réponse inflammatoire anormale et récurrente de l'organisme vis-à-vis du microbiote. De nombreuses recherches suggèrent que les bactéries commensales, pathogènes et probiotiques jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'inflammation (Elson *et al*., 1995; Darfeuille-Michaud *et al*., 2004; Kerckhoffs *et al*., 2009). Certaines d'entres elles peuvent entraîner une dysbiose du microbiote conduisant à la perte de l'homéostasie et à l'induction d'une réponse inflammatoire, tandis que d'autres peuvent rétablir cette dysbiose et influencer la réponse de l'hôte en diminuant la réaction inflammatoire (Imaoka *et al*., 2008; Sartor, 2009). L'utilisation de probiotiques possédant des effets intrinsèques anti-inflammatoires s'est révélée être une stratégie intéressante ces dernières années, en complément ou en substitut des traitements utilisés dans la prévention de MICI telles que, les colites ulcéreuses et les pouchites (Cui *et al*., 2004; Gosselink *et al*., 2004; Gionchetti *et al*., 2005). Ainsi, de nombreuses études concernant la recherche de nouvelles souches aux propriétés anti-inflammatoires se sont développées. L'enjeu étant principalement de découvrir de nouvelles souches efficaces tout en établissant leurs mécanismes d'action et ainsi préciser le dialogue bactéries-hôte. En effet, une connaissance plus approfondie des relations établies entre le microbiote et l'hôte, conduirait à mieux comprendre les raisons de la rupture de l'homéostasie, entraînant ainsi une inflammation ayant pour conséquence de nombreux dommages sur la muqueuse intestinale pouvant parfois nécessiter une chirurgie pour la personne atteinte.

Il est donc necessaire de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques en alternatives aux traitements actuels qui entraînent de nombreux effets secondaires et dont la prise quotidienne peut être difficile à gérer pour les patients.

C'est dans ce contexte que s'est située la problématique de ma thèse, à savoir, rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant les BL en tant que traitements anti-inflammatoires

de par leurs propriétés intrinsèques ou en tant qu'outils afin de délivrer des protéines anti-inflammatoires au sein du TD. Afin de répondre à cet objectif, nous avons dû optimiser les stratégies choisies d'une part, en améliorant les capacités de vectorisation de protéines d'intérêt santé des BL et d'autre part, en identifiant de nouvelles molécules et bactéries probiotiques possédant des propriétés anti-inflammatoires. Les travaux menés m'ont permis i) de cibler de nouveaux paramètres intervenant dans l'efficacité de vectorisation d'une protéine au sein du TD; ii) de contribuer à l'identification d'une bactérie commensale aux propriétés intrinsèques anti-inflammatoires et iii) de confirmer l'action anti-inflammatoire d'une enzyme anti-oxydante délivrée au sein même du TD *via* l'utilisation de BLGM. Les résultats obtenus approfondissent nos connaissances concernant le dialogue des bactéries commensales, probiotiques et recombinantes avec l'hôte. Elles apportent également de nouvelles hypothèses concernant le mécanisme d'action des effets anti-inflammatoires de bactéries probiotiques ou d'enzymes anti-oxydantes. Afin que les objectifs fixés aboutissent pleinement, il est nécessaire de poursuivre mes travaux. C'est pourquoi j'ai rassemblé ici les perspectives offertes par mes résultats : elles consistent notamment à identifier les mécanismes d'actions des bactéries et des molécules possédant des effets anti-inflammatoires mais également, à véhiculer les molécules anti-inflammatoires identifiées précédemment au sein du TD par l'intermédiaire de BLGM dont les capacités de vectorisation auront été préalablement optimisées.

II. IDENTIFICATION DES MECANISMES D'ACTION DES BACTERIES ET DES MOLECULES POSSEDANT DES EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES

1) Etude d'une bactérie commensale

De précédents travaux ont démontré la présence d'une dysbiose chez les patients atteints de MICI caractérisée par la diminution du *phylum* Firmicutes (Takaishi, *2007)*. Les travaux menés par Sokol *et al*, en 2006 suggèrent que l'espèce *F. prausnitzii* en particulier joue un rôle dans la prévention des rechutes de patients ayant subi une opération. En se basant sur l'hypothèse d'un effet protecteur de cette bactérie, nous avons analysé ses capacités anti-inflammatoires. Nos travaux ont démontré que la souche en elle-même ainsi que son surnageant possédaient des effets anti-inflammatoires conséquents sur des modèles *in vitro* mais également sur un modèle murin de colite induite par administration de TNBS

(Sokol *et al*., 2008). Notre travail suggère que les propriétés de *F. prausnitzii* proviennent d'un composant que la souche sécrète dans le milieu environnant agissant ainsi sur les cellules de l'hôte par la modification de la voie NF-κB et la sécrétion de cytokines qui en découlent.

Les perspectives de ces travaux peuvent être menées selon deux approches : i) l'identification de la molécule anti-inflammatoire produite par la bactérie et ii) l'identification des gènes responsables des effets anti-inflammatoires de *F. prausnitzii*.

Afin de répondre à ces objectifs, les stratégies envisagées concernent l'analyse du surnageant par des criblages sur des tests *in vitro* afin d'identifier et de caractériser la molécule responsable des activités anti-inflammatoires (nature, hydrophobicité, taille…). En parallèle, seront menées des stratégies basées sur la construction de banques génomiques chez *E. coli* et *L. lactis* pour identifier un clone possédant des propriétés anti-inflammatoires *in vitro*. Les clones ainsi sélectionnés feront l'objet de tests *in vivo* puis, de séquençage afin d'identifier la molécule responsable, découvrir son mode d'action et tenter de la valoriser en tant que traitement thérapeutique.

2) Etude de protéines anti-inflammatoires

Nous possédons peu d'éléments concernant les processus impliqués dans le développement des MICI, mais les recherches actuelles ont conduit à une meilleure connaissance des symptômes et des mécanismes impliqués lors de l'inflammation. Ainsi, nous savons que le stress oxydant qui intervient lors de l'inflammation est responsable de certains dommages causés à la muqueuse (Grisham *et al*., 1990; Keshavarzian *et al*., 2003). La présence d'infiltrats lymphocytaires induit la libération de DAO qui sont chez l'individu sain réprimés par la présence d'enzymes anti-oxydantes telles que la CAT et la SOD. Il a été démontré que la plupart de ces enzymes étaient soit, sous-exprimées, soit inactives chez les patients atteints de MICI empêchant ainsi l'élimination des DAO produits, ayant pour conséquences, des dommages cellulaires et histologiques caractéristiques des MICI (Kruidenier *et al*., 2003c). S'il n'est pas possible à l'heure actuelle d'agir sur les mécanismes d'induction des MICI, il est toujours possible d'intervenir sur la diminution des dommages causés par une inflammation anormale en tentant de rétablir un équilibre oxydant par l'apport d'enzymes antioxydantes au sein du TD.

C'est en se basant sur cette hypothèse, que nous avons analysé les effets anti-inflammatoires d'une SOD bactérienne *via* le modèle murin. La stratégie mise en place consistait d'une part, à étudier les effets de la SOD délivrée au sein du TD de souris *via Lb. casei* BL23 et d'autre part, de reconstituer la chaîne de détoxification des DAO par l'administration simultanée de deux souches de *Lb. casei* BL23 produisant la SOD et la CAT. Nos résultats ont confirmé notre hypothèse, à savoir la production de l'enzyme bactérienne SOD par *Lb. casei* BL23 a sans doute permis de restaurer un certain équilibre oxydant au sein du TD enflammé, prévenant ainsi les dommages causés à l'épithélium intestinal. En revanche, nos travaux ne nous permettent pas de conclure sur le bienfait de notre deuxième stratégie qui consistait à reconstituer la chaîne de détoxification des DAO et analyser ses effets envers l'inflammation. Effectivement, nous n'avons pas pu constater de diminution de symptômes inflammatoires liée à l'apport de CAT. Nous n'avons pas vérifié que la CAT active *in vitro* l'était *in vivo*. Nous ne pouvons pas exclure le fait que les souches aient eu un comportement différents *in vivo*, ne produisant pas les enzymes de façon simultanée et relativement proches l'une de l'autre. Afin qu'elles puissent agir de façon complémentaire, l'une détruisant le substrat toxique de l'autre, une nouvelle stratégie doit être adoptée. Ainsi, la perspective principale de ces travaux serait de construire une souche capable de produire seule les deux enzymes anti-oxydantes au sein de l'organisme, nous permettant ainsi de nous rapprocher des conditions réelles régnant chez un individu sain, à savoir, une libération proche et simultanée des enzymes, conduisant à une chaîne de détoxification des DAO efficace.

L'objectif à long terme des projets réalisés et des perspectives proposées sont d'aboutir à l'obtention de molécules ou de bactéries anti-inflammatoires pouvant être valorisées dans l'industrie pharmaceutique. Le traitement, sous forme de gélules contenants des probiotiques permettrait la prévention des rechutes voire, la rémission des patients atteints de MICI. Cette stratégie thérapeutique aurait l'avantage de diminuer le coût et les effets secondaires liés aux traitements actuels, permettant ainsi aux patients, de retrouver un cadre de vie agréable et d'affronter leur maladie en toute sérénité.

III. TRANSPORT DES MOLECULES ANTI-INFLAMMATOIRES AU SEIN DU TRACTUS DIGESTIF PAR L'INTERMEDIAIRE DE BACTERIES LACTIQUES GENETIQUEMENT MODIFIEES

1) Amélioration des capacités de vectorisation des BLGM

Une partie de mes travaux de thèse ont porté sur l'utilisation des BL en tant qu'outil biologique pour transporter et délivrer des protéines d'intérêt santé. De récentes études ont démontré l'avantage de cette technique, notamment dans le cadre des MICI (Steidler *et al*., 2000; Steidler *et al*., 2003; Steidler and Rottiers, 2006). En effet, la protéine possédant des effets anti-inflammatoires, peut grâce à cette technique, être délivrée au sein du TD. Son potentiel thérapeutique ainsi augmenté, permettrait également de diminuer les coûts et les effets secondaires liés à la délivrance de la même protéine en traitement par voie systémique. Ainsi de nombreuses recherches ont été effectuées concernant la construction de nouvelles souches de BL, principalement des lactocoques, produisant diverses protéines anti-inflammatoires ou anti-oxydantes telles que l'IL-10 et la SOD (Weiss *et al*., 1996; Steidler *et al*., 2003; Carroll *et al*., 2007). Peu d'études se sont intéressées à l'amélioration de cette technique en se basant sur l'augmentation des capacités de vectorisation des BL. Or cet aspect constitue un paramètre essentiel afin d'optimiser les effets de la protéine délivrée.

C'est cet objectif que j'ai poursuivi dans une partie de mes travaux de thèse, en étudiant différentes approches permettant d'améliorer l'aptitude des BL à délivrer des protéines d'intérêt santé. J'ai ainsi analysé quelle était l'influence de la lyse bactérienne sur la vectorisation d'une protéine induisant une réponse immunitaire spécifique au sein du TD. J'ai mis au point un système de production de protéines recombinantes induit par la présence de sels biliaires lors du passage de la bactérie dans le TD. Enfin, j'ai évalué l'influence du temps de transit et des capacités d'adaptation de la bactérie vectrice au sein du TD sur l'augmentation de la réponse immunitaire induite par la protéine délivrée.

Nos travaux n'ont pas pu mettre en évidence un intérêt potentiel de la lyse ou de la résistance des BLGM à l'environnement du TD sur l'optimisation des effets de la protéine délivrée. En effet, aucune différence n'a été observée concernant la réponse immunitaire induite par des mutants de lactocoques plus ou moins sensibles au lysozyme et produisant l'Ag E7. Pour autant, nous ne pouvons pas conclure sur un quelconque effet de la lyse bactérienne sur les

capacités de vectorisation. Il est avant tout nécessaire de construire et d'étudier d'autres mutants possédant des capacités de résistance plus élevés aux différents stress rencontrés *in vivo* (stress biliaire, stress oxydant, présence de lysozyme…) dans le but de leur conférer de nouvelles aptitudes pour survivre lors du passage dans le TD.

Une des principales difficultés concernant la valorisation des BLGM dans le traitement des MICI, concerne les systèmes d'expression utilisés. Les systèmes comprenant un promoteur constitutif peuvent induire une toxicité pour la bactérie vectrice de par la délivrance en continu d'une protéine hétérologue ayant pour conséquence, la diminution de la croissance bactérienne. Pour remédier à cela, des systèmes de promoteurs inductibles sont couramment utilisés : il s'agit principalement d'une induction *via* l'ajout de composés tels que l'IPTG ou la nisine dans le milieu de culture de la bactérie. Ainsi induits, les promoteurs vont être activés durant plusieurs heures permettant l'administration orale des BLGM et leurs actions au sein de l'organisme visé. La mise en place d'un tel protocole dans l'industrie pharmaceutique comporte de nombreuses limites et les travaux réalisés lors de ma thèse permettent de répondre à cette problématique. En effet, j'ai développé un nouveau système d'expression inductible *in vivo* par la présence de sels biliaires. Notre stratégie consistait à exploiter les conditions environnementales particulières qui résident au sein du TD afin d'obtenir une production localisée permettant d'augmenter les capacités thérapeutiques de la protéine. Nos travaux ont permis de démontrer qu'une telle stratégie était possible, induisant ainsi la production de la protéine d'intérêt lors du transit. Aucune manipulation au préalable n'est nécessaire, l'environnement particulier de notre organisme étant le seul déclencheur de l'activité des BLGM et le traitement par voie orale gagne en facilité.

Notre objectif visant à améliorer les capacités des BLGM à produire des protéines d'intérêt santé nous a conduit à étudier les effets du temps de transit et des capacités d'adaptation des BLGM au sein du TD, paramètre essentiel qui n'a été que très peu étudié (Cortes-Perez *et al*., 2007). Ainsi nous avons comparé deux BL aux potentiels de résistance et aux temps de transit différents au sein de l'organisme. Nos résultats démontrent que pour une même protéine délivrée selon un système d'induction identique, les capacités intrinsèques du vecteur étaient déterminantes dans l'action finale de la protéine délivrée. Nos résultats peuvent cependant être améliorés : nous avons utilisé des systèmes d'induction *in vivo* dont les promoteurs diffèrent en fonction du genre bactérien et l'utilisation du modèle d'étude choisi, à savoir, l'analyse de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'Ag E7 ne nous a pas permis d'effectuer une quantification de la protéine délivrée. Il n'est pas exclu que l'un des deux promoteurs induise

une quantité plus importante de protéines expliquant les résultats obtenus. Pourtant, même dans le cadre de cette hypothèse, notre objectif qui était de mettre au point un vecteur plus efficace de protéine d'intérêt semble être atteint et peut être mis à profit pour délivrer des protéines anti-inflammatoires afin de prévenir ou traiter des MICI.

2) Combiner les propriétés de bactéries probiotiques génétiquement modifiées aux propriétés anti-inflammatoires de nouvelles molécules identifiées

Nous possédons les connaissances permettant d'identifier de nouvelles bactéries probiotiques aux effets anti-inflammatoires. Nombre d'entres elles, sont actuellement utilisées dans la prévention des rechutes des MICI. Lors de ma thèse j'ai développé de nouveaux systèmes permettant l'expression de protéines d'intérêt santé au sein du TD par des genres bactériens possédant ces qualités probiotiques recherchées dans le cadre du traitement de l'inflammation. L'association de ces deux paramètres, à savoir, les propriétés anti-inflammatoires d'une protéine hétérologue telle que l'IL-10 ou la SOD et les qualités anti-inflammatoires de la bactérie vectrice semble être une stratégie prometteuse afin d'optimiser les effets recherchés concernant la prévention d'une inflammation. Les perspectives de mes travaux de thèse portent donc essentiellement sur la construction de souches probiotiques recombinantes telles que *Bifidobacterium* génétiquement modifiées afin de produire une protéine anti-inflammatoire *in situ via* notre système d'induction aux sels biliaires.

IV. PERSPECTIVE GENERALE

Mes travaux peuvent s'inscrire dans un axe de recherche analytique concernant la mise en place d'une stratégie BLGM dans le but de traiter les MICI. En effet, mes recherches ont permis de démontrer que la protéine d'intérêt santé n'est pas le seul paramètre à prendre en compte lors de la mise en place d'une telle stratégie, le choix du vecteur est également essentiel. Ainsi, mes travaux de thèse s'inscrivent au sein d'un même objectif : i) rechercher de nouvelles molécules anti-inflammatoires telles que celle potentiellement produite par *F. prausnitzii*; ii) construire un vecteur de sécrétion de cette même molécule par un système d'expression inductible *in vivo*, ne comportant pas de résistance aux antibiotiques et dont la modification génétique est « propre » et non-disséminable (Steidler *et al.*, 2003). Afin d'optimiser au mieux cette stratégie, on peut envisager que le transport et l'expression de cette

molécule soit réalisée par une souche probiotique dont le statut alimentaire et l'absence d'effets secondaires sont reconnus. Enfin, il s'agirait de combiner les effets de cette molécule aux propriétés intrinsèques du probiotique choisis en prenant par exemple des souches du genre *Bifidobacterium*, qui a démontré au cours de nombreux travaux ses capacités anti-inflammatoires. L'objectif final étant d'aboutir à l'élaboration d'un nouveau traitement de prise par voie orale qui permettrait d'améliorer la qualité de vie des patients atteint de MICI. En suivant la même stratégie, on peut envisager de modifier génétiquement une bactérie commensale aux propriétés anti-inflammatoires reconnues telles que *F. prausnitzii,* afin d'optimiser ses capacités par l'apport simultanée d'une protéine anti-inflammatoire telle que l'IL-10 ou la SOD. Une telle stratégie d'utilisation de bactérie commensale (*Bacteroides ovatus*) pour délivrer un facteur de croissance ayant des effets anti-inflammatoires vient d'être décrite par Hamady *et al*., 2009.

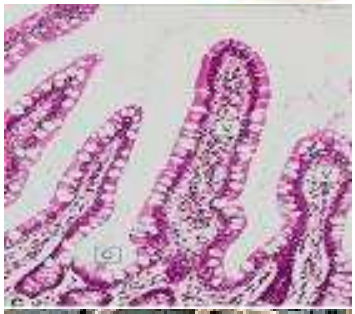
Les perspectives de mes travaux de thèse s'inscrivent également dans un axe de recherche fondamental, à savoir, l'étude des mécanismes d'action de nouvelles molécules anti-inflammatoires *via* l'utilisation du système d'expression réalisé.

Il est nécessaire d'approfondir le dialogue bactéries-hôte et cela passe par l'étude des mécanismes d'action de *F. prausnitzii* utilisant les modèles d'étude de l'inflammation *in vivo / in vitro*. Enfin, les stratégies BLGM mise en place lors de ma thèse pourront être valorisées dans le cas où on souhaite étudier les effets sur l'hôte d'une molécule d'intérêt santé.

Les outils biotechnologiques réalisés ont donc un intérêt certain au niveau fondamental, puisqu'ils peuvent être utile lors de l'étude du dialogue bactérie-hôte mais également lors de l'étude des protéines intervenant dans la réaction inflammatoire dans le but d'aboutir à une meilleure connaissance des mécanismes mis en jeu lors d'une inflammation chronique et de mettre en place les moyens de la réguler.



CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE











-A-

Abbott, A. (2004) Microbiology: gut reaction. *Nature* **427**: 284-286.

Abriouel, H., Herrmann, A., Starke, J., Yousif, N.M., Wijaya, A., Tauscher, B. *et al*. (2004) Cloning and heterologous expression of hematin-dependent catalase produced by Lactobacillus plantarum CNRZ 1228. *Appl Environ Microbiol* **70**: 603-606.

Ahola, A.J., Yli-Knuuttila, H., Suomalainen, T., Poussa, T., Ahlstrom, A., Meurman, J.H., and Korpela, R. (2002) Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol* **47**: 799-804.

Alp, G.a.A., B. (2009) Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp*. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*.

Ameho, C.K., Adjei, A.A., Harrison, E.K., Takeshita, K., Morioka, T., Arakaki, Y. *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.

André, J.M., Catala, M., and Poirier, J. (2002). L'appareil digestif. URL http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/appdigest.html

Archibald, F.S., and Fridovich, I. (1981) Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **146**: 928-936.

-B-

Baker, C.C., Phelps, W.C., Lindgren, V., Braun, M.J., Gonda, M.A., and Howley, P.M. (1987) Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* **61**: 962-971.

Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **13**: 5571-5576.

Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A.L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M. *et al*. (2007) CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* **117**: 1566-1574.

Baumer, P. (2002) *La maladie de Crohn. Information pour les patients et leur famille.*: AFA.

Benov, L., and Fridovich, I. (1999) Why superoxide imposes an aromatic amino acid auxotrophy on Escherichia coli. The transketolase connection. *J Biol Chem* **274**: 4202-4206.

Bergonzelli, G.E., Blum, S., Brussow, H., and Corthesy-Theulaz, I. (2005) Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases? *Digestion* **72**: 57-68.

Bermudez-Humaran, L.G., Langella, P., Miyoshi, A., Gruss, A., Guerra, R.T., Montes de Oca-Luna, R., and Le Loir, Y. (2002) Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in Lactococcus lactis. *Appl Environ Microbiol* **68**: 917-922.

Bermudez-Humaran, L.G., Cortes-Perez, N.G., Le Loir, Y., Alcocer-Gonzalez, J.M., Tamez-Guerra, R.S., de Oca-Luna, R.M., and Langella, P. (2004) An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. *J Med Microbiol* **53**: 427-433.

Bermudez-Humaran, L.G., Cortes-Perez, N.G., Le Loir, Y., Gruss, A., Rodriguez-Padilla, C., Saucedo-Cardenas, O. *et al*. (2003) Fusion to a carrier protein and a synthetic

propeptide enhances E7 HPV-16 production and secretion in Lactococcus lactis. *Biotechnol Prog* **19**: 1101-1104.

Bermudez-Humaran, L.G., Corthier, G and Langella, P. (2004) recent advances in the use of Lactococcus lactis as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res. Devel. Microbiology* **8**: 147-160.

Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D.W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J.P. *et al*. (2006) A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**: 754-759.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Bron, P.A., Marco, M., Hoffer, S.M., Van Mullekom, E., de Vos, W.M., and Kleerebezem, M. (2004) Genetic characterization of the bile salt response in Lactobacillus plantarum and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. *J Bacteriol* **186**: 7829-7835.

Bruewer, M., Samarin, S., and Nusrat, A. (2006) Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Ann N Y Acad Sci* **1072**: 242-252.

Butel, M.-J., and Collignon, A. (2004) Etablissement et composition de la flore microbienne intestinale. In *Flore microbienne intestinale. Physiologie et pathologie digestives.* Eurotext, L.J. (ed). Paris, pp. 19-35.

-C-

Campbell (1993) Biology. In. St Laurent Quebec, pp. 853-854.

Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P. *et al*. (2008) Interaction of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol* **125**: 286-292.

Carroll, I.M., Andrus, J.M., Bruno-Barcena, J.M., Klaenhammer, T.R., Hassan, H.M., and Threadgill, D.S. (2007) Anti-inflammatory properties of Lactobacillus gasseri expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**: G729-738.

Carvalho, F.A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C.H., Stanners, C.P., and Darfeuille-Michaud, A. (2009) Crohn's disease adherent-invasive Escherichia coli colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med*.

Chen, C.C., Louie, S., Shi, H.N., and Walker, W.A. (2005) Preinoculation with the probiotic Lactobacillus acidophilus early in life effectively inhibits murine Citrobacter rodentium colitis. *Pediatr Res* **58**: 1185-1191.

Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., Thayer, W.R., Jr., and Coutu, J.A. (1984a) Characteristics of an unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* **20**: 966-971.

Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R., Merkal, R.S., and Coutu, J.A. (1984b) Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **29**: 1073-1079.

Chopin, A., Chopin, M.C., Moillo-Batt, A., and Langella, P. (1984) Two plasmid-determined restriction and modification systems in Streptococcus lactis. *Plasmid* **11**: 260-263.

Christensen, H.R., Frokiaer, H., and Pestka, J.J. (2002) Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* **168**: 171-178.

clinicaltrials.gov (2009). A Phase 2a Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacodynamics and Efficacy of AG011 in Ulcerative Colitis. URL http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00729872

Collado, M.C., and Sanz, Y. (2007) Induction of acid resistance in Bifidobacterium: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *J Appl Microbiol* **103**: 1147-1157.

Colombel, J. (1999) Les anti TNF-α : un nouvel espoir dans le traitement de la maladie de Crohn. In: Hépato-Gastro hors série n°6.

Conte, M.P., Schippa, S., Zamboni, I., Penta, M., Chiarini, F., Seganti, L. *et al*. (2006) Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **55**: 1760-1767.

Cortes-Perez, N.G., Kharrat, P., Langella, P., and Bermudez-Humaran, L.G. (2009) Heterologous production of human papillomavirus type-16 L1 protein by a lactic acid bacterium. *BMC Res Notes* **2**: 167.

Cortes-Perez, N.G., Lefevre, F., Corthier, G., Adel-Patient, K., Langella, P., and Bermudez-Humaran, L. (2007) Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *vaccine* **25**: 6581-6588.

Cui, H.H., Chen, C.L., Wang, J.D., Yang, Y.J., Cun, Y., Wu, J.B. *et al*. (2004) Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* **10**: 1521-1525.

Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Caputi, A.P., Riley, D.P., and Salvemini, D. (2001) Protective effects of M40403, a superoxide dismutase mimetic, in a rodent model of colitis. *Eur J Pharmacol* **432**: 79-89.

-D-

Danone (2008). Rapport économique et sociale

Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N. *et al*. (2004) High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**: 412-421.

Daziel, T. (1913) Chronic intestinal enteritis. *British Medical Journal.*: 1068-1070.

de Jong, A., van Poelgeest, M.I., van der Hulst, J.M., Drijfhout, J.W., Fleuren, G.J., Melief, C.J. *et al*. (2004) Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res* **64**: 5449-5455.

De Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P., and De Vos, W.M. (1996) Controlled gene espression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3662-3667.

De Vos, W.M. (2005) Lipotechoic acid in lactobacilli: D-Alanine makes the difference. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 10763-10764.

Delgado, S., O'Sullivan, E., Fitzgerald, G., and Mayo, B. (2008) In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal Bifidobacterium species and selection of new probiotic candidates. *J Appl Microbiol* **104**: 1119-1127.

Deng, Q., Zeng, W., and Yu, Z. (2009) Signal peptide of Arabinosidase enhances secretion of interferon-alpha2b protein by Bifidobacteria longum. *Arch Microbiol* **191**: 681-686.

Desreumaux, P., and Rousseaux, C. (2004) Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte au cours des maladies inflammatoires intestinales. In *Flore microbienne intestinale. Physiologie et pathologie digestives.* Eurotext, L.J. (ed). Paris, p. 151.

Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S.D., and Renault, P. (2000) Expression of the Staphylococcus hyicus lipase in Lactococcus lactis. *Appl Environ Microbiol* **66**: 588-598.

Ducluzeau, R. (2002) Le concept de probiotique : historique, définition et principales caractéristiques = Concept of probiotic: history, definition and main characteristics. *Antibiotiques* **4**: 234-238

Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J. *et al*. (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**: 1461-1463.

Duncan, S.H., Hold, G.L., Harmsen, H.J., Stewart, C.S., and Flint, H.J. (2002) Growth requirements and fermentation products of Fusobacterium prausnitzii, and a proposal to reclassify it as Faecalibacterium prausnitzii gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 2141-2146.

Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., and Harlow, E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**: 934-937.

-E-

Ellingson, J.L., Anderson, J.L., Koziczkowski, J.J., Radcliff, R.P., Sloan, S.J., Allen, S.E., and Sullivan, N.M. (2005) Detection of viable Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Prot* **68**: 966-972.

Elson, C.O. (2000) Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology* **119**: 254-257.

Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S., and Riddell, R.H. (1995) Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **109**: 1344-1367.

Emerit, J., Pelletier, S., Likforman, J., Pasquier, C., and Thuillier, A. (1991) Phase II trial of copper zinc superoxide dismutase (CuZn SOD) in the treatment of Crohn's disease. *Free Radic Res Commun* **12-13 Pt 2**: 563-569.

-F-

Farr, S.B., and Kogoma, T. (1991) Oxidative stress responses in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Microbiol Rev* **55**: 561-585.

Favier, C., Neut, C., Mizon, C., Cortot, A., Colombel, J.F., and Mizon, J. (1997) Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **42**: 817-822.

Fiocchi, C. (2005) Inflammatory bowel disease pathogenesis: therapeutic implications. *Chin J Dig Dis* **6**: 6-9.

Flint, D.H., Tuminello, J.F., and Emptage, M.H. (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* **268**: 22369-22376.

Foligne, B., Nutten, S., Steidler, L., Dennin, V., Goudercourt, D., Mercenier, A., and Pot, B. (2006) Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: technical and microbiological aspects. *Dig Dis Sci* **51**: 390-400.

Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poiret, S., Chamaillard, M., Pot, B. *et al*. (2007a) Prevention and treatment of colitis with Lactococcus lactis secreting the immunomodulatory Yersinia LcrV protein. *Gastroenterology* **133**: 862-874.

Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S. *et al*. (2007b) Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* **13**: 236-243.

Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2005) A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* **6**: 331-337.

Fournet, J., and Dhumeaux, D. (2001) Le livre blanc de l'hépato Gastroenterologie. In. snfge (ed).

Frexinos J, Buscail L, Staumont G, Suduca JM, Otal Ph, Fourtanier G *et al*. (2003) Hépato-Gastro-Enterologie proctologie. In. Masson (ed). Paris.

Fu, G.F., Li, X., Hou, Y.Y., Fan, Y.R., Liu, W.H., and Xu, G.X. (2005) Bifidobacterium longum as an oral delivery system of endostatin for gene therapy on solid liver cancer. *Cancer Gene Ther* **12**: 133-140.

Fujimori, M. (2006) Genetically engineered bifidobacterium as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer* **13**: 27-31.

Fukata, M., Breglio, K., Chen, A., Vamadevan, A.S., Goo, T., Hsu, D. *et al*. (2008) The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for CD4+ T cell effector function in a murine model of inflammatory bowel disease. *J Immunol* **180**: 1886-1894.

-G-

Garcia-Urkia, N., Asensio, A.B., Zubillaga Azpiroz, I., Zubillaga Huici, P., Vidales, C., Garcia-Arenzana, J.M. *et al*. (2002) [Beneficial effects of Bifidobacterium lactis in the prevention of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome]. *Cir Pediatr* **15**: 162-165.

Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S. *et al*. (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**: 1355-1359.

Gionchetti, P., Lammers, K.M., Rizzello, F., and Campieri, M. (2005) VSL#3: an analysis of basic and clinical contributions in probiotic therapeutics. *Gastroenterol Clin North Am* **34**: 499-513, ix-x.

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. *Dis Colon Rectum* **47**: 876-884.

Grangette, C., Muller-Alouf, H., Hols, P., Goudercourt, D., Delcour, J., Turneer, M., and Mercenier, A. (2004) Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infect Immun* **72**: 2731-2737.

Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J. *et al*. (2005) Enhanced antiinflammatory capacity of a Lactobacillus plantarum mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10321-10326.

Greenstein, R.J., and Collins, M.T. (2004) Emerging pathogens: is Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis zoonotic? *Lancet* **364**: 396-397.

Greenstein, R.J., Su, L., Shahidi, A., and Brown, S.T. (2007) On the action of 5-amino-salicylic acid and sulfapyridine on M. avium including subspecies paratuberculosis. *PLoS One* **2**: e516.

Grisham, M.B., Gaginella, T.S., von Ritter, C., Tamai, H., Be, R.M., and Granger, D.N. (1990) Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport, and epithelial cell viability. *Inflammation* **14**: 531-542.

Guarner, F., and Malagelada, J.R. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**: 512-519.

Gueimonde, M., Garrigues, C., van Sinderen, D., de los Reyes-Gavilan, C.G., and Margolles, A. (2009) Bile-inducible efflux transporter from Bifidobacterium longum NCC2705, conferring bile resistance. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3153-3160.

Guglielmetti, S., Tamagnini, I., Minuzzo, M., Arioli, S., Parini, C., Comelli, E., and Mora, D. (2009) Study of the adhesion of Bifidobacterium bifidum MIMBb75 to human intestinal cell lines. *Curr Microbiol* **59**: 167-172.

Guyonnet, D., Chassany, O., Ducrotte, P., Picard, C., Mouret, M., Mercier, C.H., and Matuchansky, C. (2007) Effect of a fermented milk containing Bifidobacterium animalis DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* **26**: 475-486.

-H-

Hamady, Z.Z., Scott, N., Farrar, M.D., Lodge, J.P., Holland, K.T., Whitehead, T.R., and Carding, S.R. (2009) Xylan regulated delivery of human keratinocyte growth factor-2 to the inflamed colon by the human anaerobic commensal bacterium Bacteroides ovatus. *Gut*.

Han, W., and Fioramonti, J. (2008) Anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**: G353; author reply G354.

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K. *et al*. (2007) A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* **39**: 207-211.

Han, W., Mercenier, A., Ait-Belgnaoui, A., Pavan, S., Lamine, F., van, S., II *et al*. (2006) Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Inflamm Bowel Dis* **12**: 1044-1052.

Hardy, M.M., Flickinger, A.G., Riley, D.P., Weiss, R.H., and Ryan, U.S. (1994) Superoxide dismutase mimetics inhibit neutrophil-mediated human aortic endothelial cell injury in vitro. *J Biol Chem* **269**: 18535-18540.

Harper, P.H., Lee, E.C., Kettlewell, M.G., Bennett, M.K., and Jewell, D.P. (1985) Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut* **26**: 279-284.

Hartley, M.G., Hudson, M.J., Swarbrick, E.T., Hill, M.J., Gent, A.E., Hellier, M.D., and Grace, R.H. (1992) The rectal mucosa-associated microflora in patients with ulcerative colitis. *J Med Microbiol* **36**: 96-103.

Hassan, H.M., and Fridovich, I. (1979) Paraquat and Escherichia coli. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J Biol Chem* **254**: 10846-10852.

Helwig, U., Lammers, K.M., Rizzello, F., Brigidi, P., Rohleder, V., Caramelli, E. *et al*. (2006) Lactobacilli, bifidobacteria and E. coli nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J Gastroenterol* **12**: 5978-5986.

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.

Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V., and Gordon, J.I. (2003) Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* **4**: 269-273.

Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M.C., Cua, D.J., McKenzie, B.S. *et al*. (2006) Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* **203**: 2473-2483.

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J. *et al*. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 599-603.

-I-

Imaoka, A., Shima, T., Kato, K., Mizuno, S., Uehara, T., Matsumoto, S. *et al*. (2008) Anti-inflammatory activity of probiotic Bifidobacterium: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol* **14**: 2511-2516.

Imlay, J.A., and Fridovich, I. (1991) Superoxide production by respiring membranes of Escherichia coli. *Free Radic Res Commun* **12-13 Pt 1**: 59-66.

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. *J Am Coll Nutr* **22**: 56-63.

Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M., Delley, M., Fisseha, M. *et al*. (2006) A serpin from the gut bacterium Bifidobacterium longum inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J Biol Chem* **281**: 17246-17252.

Iwata, M., and Morishita, T. (1989) The presence of plasmid in *Bifidobacterium breve. Letters in applied microbiology.*: 165-168.

-J-

Jijon, H., Backer, J., Diaz, H., Yeung, H., Thiel, D., McKaigney, C. *et al*. (2004) DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* **126**: 1358-1373.

Juste, R.A., Elguezabal, N., Pavon, A., Garrido, J.M., Geijo, M.V., Sevilla, I. *et al*. (2009) Association between Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. Int J Infect Dis: 13(2):247-54.

-K-

Keighley, M.R., Arabi, Y., Dimock, F., Burdon, D.W., Allan, R.N., and Alexander-Williams, J. (1978) Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut* **19**: 1099-1104.

Kerckhoffs, A.P., Samsom, M., van der Rest, M.E., de Vogel, J., Knol, J., Ben-Amor, K., and Akkermans, L.M. (2009) Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-

associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients. *World J Gastroenterol* **15**: 2887-2892.

Keshavarzian, A., Morgan, G., Sedghi, S., Gordon, J.H., and Doria, M. (1990) Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut* **31**: 786-790.

Keshavarzian, A., Banan, A., Farhadi, A., Komanduri, S., Mutlu, E., Zhang, Y., and Fields, J.Z. (2003) Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **52**: 720-728.

Kindt, T.J., Goldsby, A.R., and Osborne, A.B. (2008) *Immunology*: Dunod. Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**: 478-485.

Kitajima, S., Morimoto, M., Sagara, E., Shimizu, C., and Ikeda, Y. (2001) Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. *Exp Anim* **50**: 387-395.

Klijn, A., Mercenier, A., and Arigoni, F. (2005) Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 491-509.

Klijn, N., Weerkamp, A.H., and de Vos, W.M. (1995) Genetic marking of Lactococcus lactis shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2771-2774.

Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R. *et al*. (2008) IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **57**: 1682-1689.

Koll, P., Mandar, R., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M., and Hammarstrom, L. (2008) Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol* **23**: 139-147.

Kono, Y., and Fridovich, I. (1983) Isolation and characterization of the pseudocatalase of Lactobacillus plantarum. *J Biol Chem* **258**: 6015-6019.

Kruidenier, L., Kuiper, I., Van Duijn, W., Mieremet-Ooms, M.A., van Hogezand, R.A., Lamers, C.B., and Verspaget, H.W. (2003a) Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol* **201**: 17-27.

Kruidenier, L., van Meeteren, M.E., Kuiper, I., Jaarsma, D., Lamers, C.B., Zijlstra, F.J., and Verspaget, H.W. (2003b) Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Free Radic Biol Med* **34**: 753-765.

Kruidenier, L., Kuiper, I., van Duijn, W., Marklund, S.L., van Hogezand, R.A., Lamers, C.B., and Verspaget, H.W. (2003c) Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* **201**: 7-16.

Kuipers, O.P. (1998) Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* **64**: 15-21.

Kullberg, M.C., Jankovic, D., Feng, C.G., Hue, S., Gorelick, P.L., McKenzie, B.S. *et al*. (2006) IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* **203**: 2485-2494.

-L-

Lakhdari, O., Cultrone, A., Tap, J., Gloux, K., Bernard, F., Ehrlich, S.D. *et al*. (2009) Functional metagenomics : a high throughput screening method to study microbiota-driven cell signaling modulation in the human gut. *submitted*.

Lan, J.G., Cruickshank, S.M., Singh, J.C., Farrar, M., Lodge, J.P., Felsburg, P.J., and Carding, S.R. (2005) Different cytokine response of primary colonic epithelial cells to commensal bacteria. *World J Gastroenterol* **11**: 3375-3384.

Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmstrom, K., Rajilic, M., Vaughan, E.E., de Vos, W.M. *et al*. (2005) Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4153-4155.

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. *Int Immunopharmacol* **8**: 574-580.

Lee, J., Mo, J.H., Shen, C., Rucker, A.N., and Raz, E. (2007) Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homoeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: 27-31.

Lee, J.H., and O'Sullivan, D.J. (2006) Sequence analysis of two cryptic plasmids from Bifidobacterium longum DJO10A and construction of a shuttle cloning vector. *Appl Environ Microbiol* **72**: 527-535.

Lemann, M. (1998) Les anti TNF : nouveau traitement de la maladie de Crohn. In: Lettre de l'afa.

Li, X., Fu, G.F., Fan, Y.R., Liu, W.H., Liu, X.J., Wang, J.J., and Xu, G.X. (2003) Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Ther* **10**: 105-111.

Lih-Brody, L., Powell, S.R., Collier, K.P., Reddy, G.M., Cerchia, R., Kahn, E. *et al*. (1996) Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **41**: 2078-2086.

Llopis, M., Antolin, M., Guarner, F., Salas, A., and Malagelada, J.R. (2005) Mucosal colonisation with Lactobacillus casei mitigates barrier injury induced by exposure to trinitronbenzene sulphonic acid. *Gut* **54**: 955-959.

-M-

MacConaill, L.E., Fitzgerald, G.F., and Van Sinderen, D. (2003) Investigation of protein export in Bifidobacterium breve UCC2003. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6994-7001.

Macfarlane, G.T., and Macfarlane, S. (2007) Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr Opin Biotechnol* **18**: 156-162.

Macpherson, A., Khoo, U.Y., Forgacs, I., Philpott-Howard, J., and Bjarnason, I. (1996) Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* **38**: 365-375.

Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**: 478-485.

Madsen, K. (2006) Probiotics and the immune response. *J Clin Gastroenterol* **40**: 232-234.

Magalhaes, J.G., Tattoli, I., and Girardin, S.E. (2007) The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* **19**: 106-115.

Mares, A., Neyts, K., and Debevere, J. (1994) Influence of pH, salt and nitrite on the heme-dependent catalase activity of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **24**: 191-198.

Martins, F.S., Silva, A.A., Vieira, A.T., Barbosa, F.H., Arantes, R.M., Teixeira, M.M., and Nicoli, J.R. (2009) Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties. *Arch Microbiol* **191**: 623-630.

Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde, K., Swings, J., and Huys, G. (2007) In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of Bifidobacterium. *J Dairy Sci* **90**: 3572-3578.

Matsumoto, S., Hara, T., Hori, T., Mitsuyama, K., Nagaoka, M., Tomiyasu, N. *et al*. (2005) Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* **140**: 417-426.

Medina, E., and Guzman, C.A. (2001) Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* **19**: 1573-1580.

Medzhitov, R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**: 819-826.

Meyrand, M., Boughammoura, A., Courtin, P., Mezange, C., Guillot, A., and Chapot-Chartier, M.P. (2007) Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in Lactococcus lactis. *Microbiology* **153**: 3275-3285.

Mishina, D., Katsel, P., Brown, S.T., Gilberts, E.C., and Greenstein, R.J. (1996) On the etiology of Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9816-9820.

Mulder, T.P., Verspaget, H.W., Janssens, A.R., de Bruin, P.A., Pena, A.S., and Lamers, C.B. (1991) Decrease in two intestinal copper/zinc containing proteins with antioxidant function in inflammatory bowel disease. *Gut* **32**: 1146-1150.

-N-

Nakamura, T., Sasaki, T., Fujimori, M., Yazawa, K., Kano, Y., Amano, J., and Taniguchi, S. (2002) Cloned cytosine deaminase gene expression of Bifidobacterium longum and application to enzyme/pro-drug therapy of hypoxic solid tumors. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 2362-2366.

Naser, S.A., Schwartz, D., and Shafran, I. (2000) Isolation of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol* **95**: 1094-1095.

Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., and Valentine, J.F. (2004) Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364**: 1039-1044.

Neu, J., and Caicedo, R. (2005) Probiotics: protecting the intestinal ecosystem? *J Pediatr* **147**: 143-146.

Neviere, R. physiologie digestive. In, p. 90.

Niwa, Y., Somiya, K., Michelson, A.M., and Puget, K. (1985) Effect of liposomal-encapsulated superoxide dismutase on active oxygen-related human disorders. A preliminary study. *Free Radic Res Commun* **1**: 137-153.

-O-

O'Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **7**: 688-693.

O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K. *et al*. (2005) Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* **128**: 541-551.

Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. (2000) The role of alpha,beta -dicarbonyl compounds in the toxicity of short chain sugars. *J Biol Chem* **275**: 34853-34857.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**: 694-702.

Oozeer, R., Goupil-Feuillerat, N., Alpert, C.A., van de Guchte, M., Anba, J., Mengaud, J., and Corthier, G. (2002) Lactobacillus casei is able to survive and initiate protein synthesis during its transit in the digestive tract of human flora-associated mice. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3570-3574.

-P-

Park, S., and Imlay, J.A. (2003) High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J Bacteriol* **185**: 1942-1950.

Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A. *et al*. (2007) Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* **39**: 830-832.

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

Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Bailon, E., Henriksson, A., Xaus, J. *et al*. (2007) A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus, in the TNBS model of rat colitis. *J Appl Microbiol* **103**: 836-844.

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.

-R-

Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B. *et al*. (2004) Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* **126**: 520-528.

Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A., and Schwartz, A. (2000) Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* **19**: 5944-5950.

Reyes Escogido, M.L., and De Leon Rodriguez, A. (2007) A novel binary expression vector for production of human IL-10 in *Escherichia coli* and *Bifidobacterium longum*. *Biotechnology letters* **29**: 1249-1253.

Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A. *et al*. (2007) Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* **39**: 596-604.

Rocha, C.D., Caetano, B.C., Machado, A.V., and Bruna-Romero, O. (2004) Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *Int Microbiol* **7**: 83-94.

Rochat, T., Gratadoux, J.J., Gruss, A., Corthier, G., Maguin, E., Langella, P., and van de Guchte, M. (2006) Production of a heterologous nonheme catalase by Lactobacillus casei:

an efficient tool for removal of H2O2 and protection of Lactobacillus bulgaricus from oxidative stress in milk. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5143-5149.

Rochat, T., Bermudez-Humaran, L., Gratadoux, J.J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., and Langella, P. (2007) Anti-inflammatory effects of Lactobacillus casei BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb Cell Fact* **6**: 22.

Roos, D. (1991) The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages. *Klin Wochenschr* **69**: 975-980.

Roselli, M., Finamore, A., Nuccitelli, S., Carnevali, P., Brigidi, P., Vitali, B. *et al*. (2009) Prevention of TNBS-induced colitis by different Lactobacillus and Bifidobacterium strains is associated with an expansion of gammadeltaT and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 1526-1536.

Rossi, M., Brigidi, P., and Matteuzzi, D. (1997) An efficient transformation system for *Bifidobacterium spp. letters in applied microbiology.* **24**: 33-36.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**: 313-323.

Ruseler-van Embden, J.G.a.B.-P., HC. (1983) Anaerobic gram negative faecal flora in patients with Crohn disease and healthy subjects. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**: 125-132.

Rutgeerts, P., and Colombel, J.-F. (1999) Traitement de la maladie de Crohn par les anticorps monoclonaux anti TNF-α. In: Hépatho-Gastro hors série n°6.

-S-

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M. *et al*. (1998) Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol* **44**: 93-106. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanchez, B., Champomier-Verges, M.C., Anglade, P., Baraige, F., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A., and Zagorec, M. (2005) Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of Bifidobacterium longum NCIMB 8809. *J Bacteriol* **187**: 5799-5808.

Sanchez, B., Champomier-Verges, M.C., Anglade, P., Baraige, F., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A., and Zagorec, M. (2008) A preliminary analysis of Bifidobacterium longum exported proteins by two-dimensional electrophoresis. *J Mol Microbiol Biotechnol* **14**: 74-79.

Sartor, B. (2009) Microbial-Host Interactions in Inflammatory Bowel Diseases and Experimental Colitis. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* **64**: 121-137.

Sartor, R.B. (1995) Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* **24**: 475-507.

Sartor, R.B. (2005) Does Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* **54**: 896-898.

Scanlan, P.D., Shanahan, F., O'Mahony, C., and Marchesi, J.R. (2006) Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J Clin Microbiol* **44**: 3980-3988.

Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G. *et al*. (2002) The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14422-14427.

Schmechel, S., Konrad, A., Diegelmann, J., Glas, J., Wetzke, M., Paschos, E. *et al*. (2008) Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum

levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm Bowel Dis* **14**: 204-212.

Scholzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B., and Thompson, J. (2000) Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol* **156**: 595-605.

Schotte, L., Steidler, L., Vandekerckhove, J., and Remaut, E. (2000) Secretion of biologically active murine interleukin-10 by Lactococcus lactis. *Enzyme Microb Technol* **27**: 761-765.

Schultz, M., Strauch, U.G., Linde, H.J., Watzl, S., Obermeier, F., Gottl, C. *et al*. (2004) Preventive effects of Escherichia coli strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**: 372-378.

Seaver, L.C., and Imlay, J.A. (2001) Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing Escherichia coli. *J Bacteriol* **183**: 7182-7189.

Segui, J., Gironella, M., Sans, M., Granell, S., Gil, F., Gimeno, M. *et al*. (2004) Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol* **76**: 537-544.

Sepehri, S., Kotlowski, R., Bernstein, C.N., and Krause, D.O. (2009) Phylogenetic analysis of inflammatory bowel disease associated Escherichia coli and the fimH virulence determinant. *Inflamm Bowel Dis*.

Sergi, R. (1997) L'intestin grêle le reflet de notre image santé. In, p. 13.

Sgorbati, B., Scardovi, V., and Leblanc, D.J. (1982) Plasmids in the genus Bifidobacterium. *J Gen Microbiol* **128**: 2121-2131.

Sheehan, V.M., Sleator, R.D., Hill, C., and Fitzgerald, G.F. (2007) Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain Bifidobacterium breve UCC2003. *Microbiology* **153**: 3563-3571.

Sheil, B., MacSharry, J., O'Callaghan, L., O'Riordan, A., Waters, A., Morgan, J. *et al*. (2006) Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice. *Clin Exp Immunol* **144**: 273-280.

Shin, S.J., and Collins, M.T. (2008) Thiopurine drugs azathioprine and 6-mercaptopurine inhibit Mycobacterium paratuberculosis growth in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 418-426.

Shkoporov, A.N., Efimov, B.A., Khokhlova, E.V., Kafarskaia, L.I., and Smeianov, V.V. (2008) Production of human basic fibroblast growth factor (FGF-2) in Bifidobacterium breve using a series of novel expression/secretion vectors. *Biotechnol Lett* **30**: 1983-1988.

Sibartie, S., Scully, P., Keohane, J., O'Neill, S., O'Mahony, J., O'Hanlon, D. *et al*. (2009) Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (MAP) as a modifying factor in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*.

Simmonds, N.J., Allen, R.E., Stevens, T.R., Van Someren, R.N., Blake, D.R., and Rampton, D.S. (1992) Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **103**: 186-196.

Smotkin, D., and Wettstein, F.O. (1986) Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4680-4684.

Société Nationale Française de Gastroenterologie (1999a) Rectocolite hemorragique. In.

Société Nationale Française de Gastroenterologie (1999b) La maladie de Crohn. In.

Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L. *et al*. (2009) Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 1183-1189.

Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I. *et al*. (2006) Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **12**: 106-111.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.J. *et al*. (2008) Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 16731-16736.

Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15451-15455.

Steidler, L., and Rottiers, P. (2006) Therapeutic drug delivery by genetically modified Lactococcus lactis. *Ann N Y Acad Sci* **1072**: 176-186.

Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neirynck, S., Obermeier, F., Falk, W. *et al*. (2000) Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. *Science* **289**: 1352-1355.

Steidler, L., Neirynck, S., Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Goddeeris, B. *et al*. (2003) Biological containment of genetically modified Lactococcus lactis for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* **21**: 785-789.

Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., and Lochs, H. (2005) Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* **43**: 3380-3389.

-T-

Takaishi, H., Matsuki, T., Nakazawa, A., Takada, T., Kado, S., Asahara, T., Kamada, N., Sakuraba, A., Yajima, T., Higuchi, H., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Nomoto, K., Tanaka, R and Hibi, T. (2007) Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *International Journal of Medical Microbiology* **298**: 463-472.

Tanaka, A., Noda, T., Yajima, H., Hatanaka, M., and Ito, Y. (1989) Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J Virol* **63**: 1465-1469.

Tannock, G.W. (2002) Exploring the relationships between intestinal microflora and inflammatory conditions of the human bowel and spine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 529-535.

Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.P. *et al*. (2009) Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* **11**: 2574-2584.

Trebichavsky, I., Rada, V., Splichalova, A., and Splichal, I. (2009) Cross-talk of human gut with bifidobacteria. *Nutr Rev* **67**: 77-82.

Turrens, J.F., Crapo, J.D., and Freeman, B.A. (1984) Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* **73**: 87-95.

Tuzun, A., Erdil, A., Inal, V., Aydin, A., Bagci, S., Yesilova, Z. *et al*. (2002) Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem* **35**: 569-572.

-V-

Van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R.J., de Vos, W.M., and Simons, G. (1990) Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from Lactococcus lactis subsp. lactis MG1363. *Gene* **95**: 155-160.

Van Der Werf, M.J.a.V., K. (2001) Bifidobacteria: genetic modification and the study of their role in the colon.
. *journal of agricultural and food chemistry* **49**: 378-383.

Venturi, A., Gionchetti, P., Rizzello, F., Johansson, R., Zucconi, E., Brigidi, P. *et al*. (1999) Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **13**: 1103-1108.

Vesa, T., Pochart, P., and Marteau, P. (2000) Pharmacokinetics of Lactobacillus plantarum NCIMB 8826, Lactobacillus fermentum KLD, and Lactococcus lactis MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* **14**: 823-828.

Villarrea, M.R. (2006). Digestive system diagram URL http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Digestive_system_diagram_en.svg

-W-

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.

Warrino, D.E., Olson, W.C., Scarrow, M.I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R.S., Da Silva, D.M. *et al*. (2005) Human papillomavirus L1L2-E7 virus-like particles partially mature human dendritic cells and elicit E7-specific T-helper responses from patients with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in vitro. *Hum Immunol* **66**: 762-772.

Warrino, D.E., Olson, W.C., Knapp, W.T., Scarrow, M.I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R.S. *et al*. (2004) Disease-stage variance in functional CD4(+) T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus-16 E7 epitopes. *Clin Cancer Res* **10**: 3301-3308.

Weber, C.R., and Turner, J.R. (2007) Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall? *Gut* **56**: 6-8.

Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C. *et al*. (2007) Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363. *J Bacteriol* **189**: 3256-3270.

Weiss, R.H., Fretland, D.J., Baron, D.A., Ryan, U.S., and Riley, D.P. (1996) Manganese-based superoxide dismutase mimetics inhibit neutrophil infiltration in vivo. *J Biol Chem* **271**: 26149-26156.

Wine, E., Ossa, J.C., Gray-Owen, S.D., and Sherman, P.M. (2009) Adherent-invasive Escherichia coli, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol* **9**: 180.

Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A., and Jenkins, D.J. (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **40**: 235-243.

-X-

Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**: 427-434.

Xu, Y.F., Zhu, L.P., Hu, B., Fu, G.F., Zhang, H.Y., Wang, J.J., and Xu, G.X. (2007) A new expression plasmid in Bifidobacterium longum as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* **14**: 151-157.

-Y-

Yamada, Y., Marshall, S., Specian, R.D., and Grisham, M.B. (1992) A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* **102**: 1524-1534.

Yang, H., Shi, M., Richardson, A., Vijg, J., and Guo, Z. (2003) Attenuation of leukocyte-endothelium interaction by antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* **35**: 266-276.

Yasui, K., Kano, Y., Tanaka, K., Watanabe, K., Shimizu-Kadota, M., Yoshikawa, H., and Suzuki, T. (2009) Improvement of bacterial transformation efficiency using plasmid artificial modification. *Nucleic Acids Res* **37**: e3.

Yi, C., Huang, Y., Guo, Z.Y., and Wang, S.R. (2005) Antitumor effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by Bifidobacterium infantis on melanoma. *Acta Pharmacol Sin* **26**: 629-634.

-Z-

Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* **33**: 337-349.

Zeuthen, L.H., Fink, L.N., and Frokiaer, H. (2008) 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.

zur Hausen, H. (1991) Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184**: 9-13.

Zwerschke, W., and Jansen-Durr, P. (2000) Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res* **78**: 1-29.