



HAL
open science

Identification de nouvelles souches probiotiques à propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes

Noura Kechaou Larguèche

► **To cite this version:**

Noura Kechaou Larguèche. Identification de nouvelles souches probiotiques à propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112059 . tel-01499147

HAL Id: tel-01499147

<https://theses.hal.science/tel-01499147>

Submitted on 31 Mar 2017

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.

Doctorat en Sciences

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Université Paris Sud

Spécialité : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Noura KECHAOU

le 30 mars 2012

Identification de nouvelles souches probiotiques à propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes

Directeur de thèse : **Philippe LANGELLA**

Co-encadrement de la thèse : **Luis BERMUDEZ-HUMARAN**

Jury

M. Armel GUYONVARCH, Professeur, Université Paris Sud

Mme. Corinne GRANGETTE, Chargée de Recherches, Institut Pasteur Lille

M. Yves LE LOIR, Directeur de Recherches, INRA

M. Maarten VAN DE GUCHTE, Directeur de Recherches, INRA

Mme. Patricia RAMOS, Responsable Scientifique, Senoble

M. Pascal MOLIMARD, Directeur Management, Merck Médication Familiale

M. Philippe LANGELLA, Directeur de Recherches, INRA

M. Luis BERMUDEZ-HUMARAN, Chargé de Recherches, INRA

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Invité

Invité

Directeur de thèse

Co-encadrant de thèse

A mes parents, pour l'amour du savoir et de la science que vous m'avez transmis

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse. Merci au Professeur Armel Guyonvarch de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir toujours facilité mes inscriptions à l'université.

Je remercie aussi Corinne Grangette et Yves Le Loir pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que pour le temps que vous avez consacré à la lecture de mon manuscrit. Je vous suis également reconnaissante pour vos encouragements durant la période de rédaction.

Je remercie également nos partenaires industriels Patricia Ramos, Pascal Molimard et Stéphanie Coureau, ainsi que nos partenaires académiques du GPMA pour les discussions intéressantes que nous avons eues, et pour leur implication tout au long de ce projet.

Merci à Pascale Serror et Maarten van de Guchte pour vos remarques intéressantes et vos conseils avisés.

Merci à toute l'équipe ProbiHôte pour votre accueil chaleureux. Loin de ma famille, j'ai retrouvé en vous une famille de substitution, très accueillante.

Merci à toi, Philippe, de m'avoir accueillie dans ton équipe et de m'avoir confié un projet aussi intéressant. Même à plus de 6000 km, tu as su te montrer toujours présent et disponible pour me guider et répondre à mes questions. J'admire ta passion pour la science, ton amour de la précision et ta capacité à simplifier les choses. Je te remercie également de m'avoir toujours incitée à participer aux congrès. Merci aussi pour tes nombreux conseils, ton soutien et surtout pour tes encouragements durant ma dernière année.

Un grand merci à Luis pour avoir été co-encadrant de ma thèse. Merci d'avoir toujours répondu présent à mes appels au secours pour la correction de mes rapports, toujours à la dernière minute (sinon ce n'est pas drôle). Mais aussi pour ton aide inestimable pour la culture cellulaire, ainsi qu'au moment des nombreux abattages. J'ai beaucoup appris à tes côtés et je te suis reconnaissante pour la confiance et de la liberté que tu m'as accordées.

Florian, comment vais je trouver les mots pour te remercier ? Dès les premiers jours de notre aventure si particulière, tu m'as dit que tu allais m'apprendre à ne pas paniquer ! Trois ans plus tard, je pense que tu y es arrivé. Je ne voudrais pas tomber dans les clichés du genre « sans toi, je n'y serai pas arrivée » ; mais je pense que tu as joué un grand rôle dans la réussite du projet. Au nom de toutes les bactéries, les cellules et les souris : Merci ! Ton surnom de « Super PostDoc » a fait des envieux, mais tu le mérites largement. J'espère que tu trouveras le poste qui te permettra de t'épanouir tout en continuant à transmettre ton savoir, comme tu l'as fait avec moi.

Jean Marc, c'est un peu le « maktoub » qui a fait que tu participes à mon projet et je te suis reconnaissante pour les nombreuses discussions que nous avons eues, et que j'ai trouvées particulièrement enrichissantes.

Jean Jacques, tu as été présent depuis le tout premier jour de ma thèse, et j'ai beaucoup appris grâce à toi. Merci pour tes encouragements, pour ta patience, pour tes blagues et ton aide inestimable. A bientôt peut être ?

Chantal, je me rappelle encore des moments passés devant le microscope à nous extasier devant les bifides que nous observions au début de ma thèse. Merci pour ta patience, ton dévouement, et ta gentillesse. Tu as toujours été là pour me guider et je t'en suis reconnaissante.

Lilou, même si tu refuses de l'admettre, c'est grâce à toi que j'ai eu la chance de faire cette thèse. Tu as entendu parler d'un sujet de thèse et en bonne amie, tu m'as mise au courant et c'est ainsi que nous avons pu faire ce parcours dans la même équipe. Merci pour ton amitié, si chère à mes yeux.

Julie c'est mon amie !! Tu fais partie des plus belles rencontres que j'ai faites durant mon passage à l'INRA. Tu es devenue une véritable amie et tu as eu de nombreuses occasions de le montrer. Merci de m'avoir consacré du temps à chaque fois que je te l'ai demandé.

Aurore, nous n'étions pas destinées à travailler ensemble, et pourtant !!! J'ai adoré travailler à tes côtés. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, même après ton retour à Nantes. Je garde d'excellents souvenirs des moments passés avec toi, même si on devait commencer à 6 heures et finir à 22 heures ! Nous avons cru ne jamais y arriver par moments et pourtant !! Courage pour les mois qui te restent avant la délivrance. Et n'oublie pas que tu es la meilleure !

Camille, j'ai trouvé en toi une âme sœur et nous avons tellement de points en commun. Je te suis très reconnaissante pour toute l'aide que tu m'as apportée. Merci de ton écoute, durant mes moments de découragements et de m'avoir toujours remonté le moral.

A mes collègues de bureau, vous m'avez offert des séances de rigolades inoubliables ! Vous m'avez aussi aidée moralement durant ma période de rédaction et je vous en remercie. Vous êtes tous géniaux et je vous souhaite le meilleur pour la suite. Merci pour votre gentillesse, pour votre compréhension, pour votre écoute et pour votre soutien inconditionnel. Stéphane, tu n'as pas arrêté de vouloir me sortir de mon monde en m'envoyant des post-it dans le dos, et malgré ton assiduité, tu n'y es jamais arrivé. Je te dois aussi une parfaite maîtrise de EndNote. Sylvie, merci pour ta sympathie et tes encouragements. Je suis épatée par ta persévérance devant les soucis du quotidien et te souhaite de trouver LE poste qui te correspond à côté des tiens. Laure L, merci pour toutes nos discussions en rentrant le soir sur Paris, je te souhaite beaucoup de courage pour la fin de ta thèse. Pascale, merci de nous avoir fait partager ton humour, tes blagues et ta bonne humeur. Je n'oublierai pas tes conseils d'experte en bio-mol. Laure D, j'ai adoré te taquiner et tes plaisanteries en retour. Tu es géniale, même si tu attires les embouteillages et je te souhaite une fin de thèse pleine de résultats publiables dans Nature. Marion, merci pour le vent de fraîcheur que tu as apporté à ma phase de rédaction, tu m'as permis de garder un lien avec la paillasse et de rendre mes derniers mois très agréables. Je souhaite que tu décroches une bourse pour vivre l'expérience merveilleuse que j'ai vécue.

Sylvie H, nous sommes arrivées dans l'équipe le même jour et nous partirons aussi le même jour, coïncidence ? Te voilà d'attaque pour une nouvelle expérience. Je te souhaite une agréable retraite bien remplie, comme tu le souhaitais. J'ai adoré les moments que nous avons passé ensemble sur la paillasse, et te suis reconnaissante pour tes conseils avisés.

Merci Rebecca pour m'avoir encouragée. Tu es quelqu'un d'épatant et j'ai adoré planifier nos manip ensemble et les faire dans la joie et la bonne humeur. Bon courage pour la suite !

Marcella, Gaëlle (Huiiii; je pense que rien que pour cela, je ne t'oublierai pas de sitôt), Jon, Asri, Malik, Christophe, Olivier, Denis, Fatma, Félix et Juliana, merci pour votre sympathie, vos encouragements et les sourires échangés dans les couloirs.

Merci aux filles de l'autre côté, Muriel, Claire, Camille, Marie-Louise, Véronique, Julie et Laura pour votre gentillesse et votre disponibilité. Vous m'avez toujours accueillie chaleureusement et m'avez toujours permis de travailler dans de bonnes conditions.

Merci à Sébastien et Laurie pour votre amitié. Je n'oublierai jamais tous les moments que passés ensemble. Vous avez laissé un grand vide en partant.

Merci aussi à Harry pour le temps que tu as passé à lire les lames histologiques. Ton expertise a été d'une grande aide.

Merci à Franck pour avoir accouru à mon secours à chaque fois que mon ordinateur rencontrait un problème ou que j'avais besoin d'un logiciel.

Merci à Bernard Cayron de m'avoir ouvert les portes de l'animalerie et à toute l'équipe de l'UEAR. J'ai fait le compte, après 11 essais dans vos locaux, et autant de week ends passés avec les animaliers, j'ai appris à mieux vous connaître et vous m'avez beaucoup appris. Merci Jérôme, Marlène, Blondine et Charline pour votre aide inestimable. Je voudrais remercier en particulier Laetitia et Alice, mes animalières préférées, pour m'avoir tout appris sur les souris, je me souviens encore de mes premiers jours avec elles et des derniers ! Entre les deux et grâce à vos conseils, la différence est frappante ! Que toutes les souris sacrifiées reposent en paix dans le paradis des souris. Merci pour tous nos quizz musicaux, pour toutes les histoires sympas que nous nous sommes racontées. Vous avez fait des fins d'essais, des moments inoubliables.

Merci à nos collègues de la VIM : Nicolas, Ronan, Christophe, Edwige et Olivier pour votre aide inestimable. J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous.

Merci à toute l'équipe de Philippe Gérard et Anaxem pour les cafés partagés ensemble. Merci en particulier à Pascal pour ton aide à chaque fois que j'en ai eu besoin.

Merci aux secrétaires, Sovanny, Aurore, Brigitte, Françoise, Sandrine, Christine, Françoise et Sophie pour votre aide et votre amabilité.

Un grand merci à Anne-Marie et Lise de la laverie. Grâce à vous, j'ai toujours pu travailler dans les meilleures conditions.

Je remercie aussi Bruno et Guillaume, les thésards dijonnais du projet pour leur aide et les échanges que nous avons eus durant ces 3 dernières années.

A mes parents, Habib et Zineb, merci pour vos encouragements, pour votre soutien, et votre amour inconditionnel. Etre loin de vous n'a pas toujours été évident, mais vous avez toujours été là pour m'encourager

dans les moments où j'en avais le plus besoin. Merci d'avoir relu ma thèse et me l'avoir corrigée. Vous avez appris de nouvelles choses grâce à moi, et j'en suis fière.

Merci Chedly pour ton soutien et ton affection. Que tu le veuilles ou non, tu es et tu resteras mon modèle. J'espère que tu es fier de ta petite sœur.

A toute ma famille, à mes mamies pour leur tendresse et leurs prières. A toutes mes tantes et mes oncles, et en particulier Salah, Emna, Hajer et Hamadi pour votre gentillesse et vos encouragements. Un grand merci à mes cousins Sonia, Saadia et Slim et vos petites familles pour l'affection que vous me portez. Merci aussi à ma tante et ma cousine de cœur, Dandoun et Héla, je ne vous remercierai jamais assez pour votre accueil chaleureux et tous les bons moments passés ensemble.

A mes beaux parents Slim et Dalila, merci pour votre soutien, pour votre disponibilité et votre amour. Je suis très heureuse de faire partie de votre famille. Sans cette thèse, nous n'aurions jamais connu Balby le punk, plus connu sous le nom de Pancacke !!

Amanda, merci de m'avoir supportée pendant tes séjours chez nous, je n'ai pas du être facile à vivre tous les jours. De Nancy à Freemont, en passant par Paris, tu m'as encouragée à aller de l'avant et réconfortée lorsque je n'allais pas bien. Merci de m'avoir offert Sourisette, je l'aime beaucoup.

Merci à Didou et sa petite famille pour vos encouragements et votre soutien. Une dédicace spéciale à Sélina, pour tes beaux sourires et toutes tes vidéos marrantes qui ont ensoleillé mes journées.

Mes amis Sélimette, Sawessin, Manna, Saadoun, Sonia kattousti, Michou, Cha, ZoumZoum, Chamchoumte, Hajer bantouta, Mariem Tiiti, Serenna, Ra3rou3ti, Zahafti, Gus, Manu, Do et Fatma, je ne vous remercierai jamais assez pour votre amitié et votre patience. Pour toutes les soirées passées loin de vous, ou les fois où je devais rentrer tôt, parce qu'il faut bien quelqu'un pour s'occuper des souris.

A mon mari, Hatem, merci pour tout l'amour que tu me portes ! Sans toi à mes côtés, je ne sais pas comment j'aurais fini ce projet. Comme tu le dis, 3 ans c'est long !! Merci pour ton dévouement et pour ta patience. Pour toutes les fois où tu m'as consolée, mais tu ne comprenais pas pourquoi. Pour tous les week ends passés loin de toi ! Et pour toutes les fois où je n'étais tout simplement pas de bonne humeur. Tu as cru en moi, et j'espère que tu seras toujours fier de moi. Au final, tu as fini par intégrer des mots comme bactéries, ADN, et reproductibilité dans ton vocabulaire. Tu es ma plus belle réussite.

SOMMAIRE

RESUME.....	5
ABSTRACT	6
ABREVIATIONS	7
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	10
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	14
AVANT-PROPOS.....	15
INTRODUCTION.....	17
I. LES REPONSES IMMUNITAIRES	18
1. Immunité innée.....	18
1.1. Barrières anatomiques	18
1.2. Cellules immunitaires.....	19
1.3. Reconnaissance des bactéries	19
1.4. Cytokines.....	22
2. Immunité adaptative	25
II. Les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse MALT.....	28
1. Les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale GALT	28
1.1. Présentation générale.....	28
1.2. Colonisation bactérienne	30
1.3. Cellules immunitaires.....	31
2. Les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse nasale NALT	33
2.1. Présentation générale.....	33
2.2. Colonisation bactérienne	33
2.3. Cellules immunitaires.....	34
III. LES BACTERIES PROBIOTIQUES ALIMENTAIRES	37
1. Définition.....	37
2. Comment sélectionner une souche probiotique ?.....	39
2.1. Quelle bactérie sélectionner ?.....	40
2.2. Tests in vitro à effectuer sur la souche	42
2.3. Tests technologiques et passage chez l'homme	43

3.	Probiotiques et allégations.....	45
4.	Dialogue bactérie/hôte.....	46
5.	Mécanisme d'action des bactéries probiotiques	51
IV.	UTILISATION DES PROBIOTIQUES EN SANTE HUMAINE.....	55
1.	Identification de souches immuno-modulatrices <i>in vitro</i>	55
2.	Probiotiques et infections hivernales.....	57
2.1.	Infections hivernales.....	58
2.2.	Modèles d'étude chez l'animal.....	59
2.3.	Modèles d'étude chez l'homme.....	61
3.	Probiotiques et inflammation intestinale	64
3.1.	Inflammation intestinale.....	64
3.2.	Modèles d'étude chez l'animal.....	64
3.3.	Modèles d'étude chez l'homme.....	71
4.	Probiotiques et stress oxydant	72
4.1.	Stress oxydant.....	72
4.2.	Modèles d'étude chez l'animal.....	74
4.3.	Modèles d'étude chez l'homme.....	76
V.	PRESENTATION DU PROJET	80
MATERIELS & METHODES.....		81
I.	Souches bactériennes et conditions de croissance.....	82
II.	Etude des propriétés immuno-modulatrices des souches de la collection <i>in vitro</i>	84
1.	Criblage avec les cellules sanguines PBMC	84
2.	Criblage avec la lignée épithéliale HT-29.....	85
III.	Etude des résistances au stress des souches de la collection <i>in vitro</i>	86
IV.	Modèle <i>in vivo</i> d'étude des propriétés immuno-modulatrices de BL dans le cadre d'une infection grippale.....	89
1.	Inoculation virale chez la souris.....	89
2.	Préparation des bactéries.....	90
3.	Evaluation des scores visuels	90
4.	Lavages broncho-alvéolaires	90
5.	Dosage de la charge virale.....	91
6.	Analyses statistiques.....	91
V.	Modèle <i>in vivo</i> d'étude des propriétés anti-inflammatoires de BL dans le cadre d'une inflammation intestinale induite au DSS.....	92

1.	Inflammation intestinale chez les souris.....	92
2.	Préparation des bactéries	93
3.	Suivi des paramètres de l'inflammation intestinale.....	93
4.	Dosage des cytokines	94
5.	Analyses statistiques.....	94
VI.	Modèle <i>in vivo</i> d'étude des propriétés anti-oxydantes de BL	95
1.	Stress oxydant chez les souris	95
2.	Préparation des bactéries	96
3.	Paramètres de suivi des effets des bactéries	96
4.	Analyses statistiques.....	97
VII.	Caractérisations biochimiques et génétiques des souches sélectionnées.....	98
RESULTATS & DISCUSSION		99
I.	Identification de souches immuno-modulatrices <i>in vitro</i>	101
1.	Contexte de l'étude.....	101
2.	Résultats	101
3.	Discussion	104
II.	Etude de la résistance des souches de la collection aux stress	106
1.	Contexte de l'étude.....	106
2.	Résultats	106
3.	Discussion	109
III.	Identification d'une souche « anti- grippale »	110
1.	Contexte de l'étude.....	110
2.	Résultats	110
3.	Discussion	115
IV.	Identification de souches ayant un effet contre les inflammations intestinales.....	119
1.	Contexte de l'étude.....	119
2.	Résultats	119
3.	Discussion	126
V.	Identification de souche bactérienne anti-oxydante	128
1.	Contexte de l'étude.....	128
2.	Résultats	129
3.	Discussion	133

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	136
BIBLIOGRAPHIE	141
ANNEXES	150
Annexe 1 : Souches de la collection bactérienne constituée	151
Annexe 2 : Composition du régime AIN-93M carencé ou non.....	154
Annexe 3 : Publication (soumission dans Applied and Environmental Microbiology)	156

RESUME

Depuis quelques années, les probiotiques sont devenus un front de science très actif. La majorité des bactéries probiotiques actuellement sur le marché sont des bactéries lactiques. L'identification de nouvelles souches bactériennes aux propriétés probiotiques est l'objectif principal de ces travaux de thèse, et s'inscrivent dans le cadre du projet Probiotique en partenariat avec deux groupes industriels et le pôle de compétitivité VITAGORA.

L'objectif de ma thèse est la sélection de souches bactériennes à propriétés immuno-modulatrices et/ou anti-oxydantes parmi une collection de souches que nous avons constituée à partir de la collection de souches du CIRP, d'un producteur de ferments et des souches témoins de la collection de notre équipe. Pour identifier des souches immuno-modulatrices, une sélection a été faite sur la base de tests en modèles cellulaires *in vitro* sur des modèles cellulaires (cellules sanguines PBMC et lignée épithéliale intestinale humaine HT-29). En parallèle, nous avons étudié la résistance de ces souches à des stress oxydants et aux sels biliaires *in vitro*.

Les souches immuno-modulatrices sélectionnées suite au premier criblage ont été ensuite testées sur deux modèles animaux i) modèle d'infection par le virus de la grippe chez la souris et ii) modèle d'inflammation intestinale chez la souris induite par le DSS, afin de confirmer *in vivo* les propriétés de ces souches. La souche *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1997 a ainsi été identifiée pour ses propriétés « anti-grippales ». Par ailleurs, la souche *Lactobacillus paracasei* VEL12195 a montré une tendance à atténuer les inflammations intestinales.

Afin d'identifier des souches anti-oxydantes, nous avons sélectionné des souches après avoir étudié leurs résistances aux stress et leurs propriétés anti-oxydantes *in vitro*. Ces souches potentiellement anti-oxydantes ont ensuite été testées dans un modèle murin de stress oxydant modéré induit par une carence alimentaire en sélénium et en vitamine E. Les résultats de cette étude ont mené à l'identification de la souche *Lactobacillus zeae* VEL12211 comme souche bactérienne potentiellement anti-oxydante, dont les propriétés devront être confirmées lors d'un nouvel essai.

Mots-clés : probiotiques, bactéries lactiques, immuno-modulation, anti-oxydants

ABSTRACT

In recent years, probiotics market is boosting. Most probiotic bacteria on the market today are lactic acid bacteria. The identification of novel bacterial strains with probiotic properties is the main objective of this thesis, which is part of the Probiotic project in partnership with two industry groups and the network innovation VITAGORA.

The aim of my PhD is the identification of new bacterial strains with immunomodulatory and / or antioxidant properties among a collection of around 150 bacteria that we have established from the CIRM collection, from an independent ferments producer and from our group's collection. To identify immunomodulatory strains, a selection was performed on the basis of *in vitro* models (human peripheral blood mononuclear cells PBMC and human intestinal epithelial cells HT-29). In parallel, the strains resistance to oxidative stress and bile salts *in vitro* was studied.

Immunomodulatory strains selected after the first screening were then tested in two different animal models of i) a mouse model of infection with influenza virus and ii) a murine model of intestinal inflammation induced by DSS, to confirm *in vivo* the strains properties. The strain *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1997 has been identified for its “anti-influenza” properties. Moreover, the strain *Lactobacillus paracasei* VEL12195 showed a tendency to reduce intestinal inflammation. The effects of this strain should be confirmed in another inflammation model.

To identify antioxidant strains, we selected strains on the basis of their resistance to stress and their antioxidant properties *in vitro*. These potentially antioxidant strains were then tested in a murine model of mild oxidative stress induced by a dietary deficiency of selenium and vitamin E. The results of this study led to the identification of *Lactobacillus zeae* VEL12211 bacterial strain as potentially antioxidant, whose properties should be confirmed in another test.

Keywords: probiotic, lactic acid bacteria, immunomodulation, antioxidant

ABBREVIATIONS

Ac : anticorps

AGCC : Acides Gras à Chaîne Courte

BALF : Broncho-Alveolar Lavage Fluid

BL : Bactérie lactique

CAT : Catalase

CD : Cellule dendritique

CLR : C-lectin-Like Receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'Antigène

CSF : Colony-Stimulating Factors

DAI : Disease Activity Index

DAO : Dérivés Actifs Oxygénés

DO: Densité optique

DSS : Dextran Sodium Sulfate

EFSA : European Food Safety Authority

EPS : exopolysaccharides

GALT : Gut- Associated Lymphoid Tissue

GRAS : Generally Regarded As Safe

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IL : Interleukines

IRF: Interferon Regulatory Factors

ISG : IFN-Stimulated Genes

KO : Knock Out

LB : Lymphocyte B

LPS : Lipopolysaccharides

LRR : Leucine-rich-Repeats

LT : Lymphocyte T

LTA : Acide lipotéichoïque

MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue

MAMP : Microbe-Associated Molecular Pattern
MC : Maladie de Crohn
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
MDA : Malondialdéhydes
MDCK: Madin-Darby Canine Kidney
MICI: Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein-1 α
MLN : Nœud Lymphatique Mésentérique
MOI : Multiplicité d'infection
MyD88 : Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
MPO : myéloperoxydase
NALT : Nasal-Associated Lymphoid Tissue
NK : Natural Killer
NLR : Nod-Like Receptor
O₂^{•-} : Ion superoxyde
OH[•] : Radical hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAMP : Pathogen -Associated Molecular Pattern
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS : phosphate buffered saline
PCOOH : phosphatidylcholine hydroperoxyde
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG : Peptidoglycane
PP : Plaques de Peyer
PRR : Pattern Recognition Receptors
QPS : Qualified Presumption of Safety
RCH : Rectocolite Hémorragique
RLR : RIG-I-Like Receptor
SB: Sels biliaires
SED : Sub-Epithelial Dome
SOD : superoxyde dismutase
SFV: Sérum de Veau Foetal
TAA : Total Antioxidative Activity
TAS : Total Antioxidative Status

TD : Tractus Digestif

Th : T helper

TIR : Toll-Interleukin 1 Receptor

TLR : Toll-Like Receptor

TNBS : 2,4,6-Tri-Nitrobenzene Sulfonic Acid

TNF : Tumor Necrosis Factor

UFC : Unité Formant Colonie

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications affichées

Noura Kechaou, Florian Chain, Jean Marc Chatel, Nicolas Bertho, Ronan Le Goffic, Christophe Chevalier, Philippe Langella and Luis G. Bermúdez-Humarán. IDENTIFICATION OF A NOVEL PROBIOTIC *LACTOBACILLUS PLANTARUM* STRAIN WITH POTENT ACTIVITY AGAINST INFLUENZA VIRUS H1N1 INFECTION, 2nd International Symposium December 1-2, 2011 Paris.

Noura Kechaou, Florian Chain, Jean Marc Chatel, Nicolas Bertho, Ronan Le Goffic, Christophe Chevalier, Philippe Langella and Luis G. Bermúdez-Humarán. LARGE SCALE SCREENING OF GRAM POSITIVE BACTERIA: IDENTIFICATION OF NOVEL PROBIOTIC BACTERIA TO PROTECT AGAINST INFLUENZA VIRUS H1N1 INFECTION IN MICE, LAB10, Tenth symposium on Lactic Acid Bacteria, August 28 to September 1, 2011 Egmond aan Zee, the Netherlands.

Noura Kechaou, Florian Chain, Jean Marc Chatel, Nicolas Bertho, Ronan Le Goffic, Christophe Chevalier, Philippe Langella and Luis G. Bermúdez-Humarán, LARGE SCALE SCREENING OF GRAM POSITIVE BACTERIA: IDENTIFICATION OF NEW PROBIOTIC STRAINS, Microbiota and mucosal immunology: the interface in health and disease, a Nature conference, 14-16 April 2011, San Francisco CA, USA.

Florian Chain, Bruno Ebel, **Noura Kechaou**, Guillaume Lemetais, Laurent Beney, Rémy Cachon, Patrick Gervais, Jean-Marc Chatel, Philippe Langella and Luis G. Bermúdez-Humarán, HIGH-THROUGHPUT SCREENING METHOD TO ISOLATE NOVEL ANTIOXIDANT PROBIOTIC STRAINS, Microbiota and mucosal immunology: the interface in health and disease, a Nature conference, 14-16 April 2011, San Francisco CA, USA.

Noura KECHAOU, Florian CHAIN, Jean-Jacques GRATADOUX, Chantal BRIDONNEAU, Edith HONVO-HOUETO, Claire CHERBUY, Luis BERMUDEZ-HUMARAN et Philippe LANGELLA, Criblage à haut débit et multifactoriel de souches probiotiques immuno-modulatrices et résistantes aux stress simulant le passage dans le tractus digestif, CBL 2010, 17^{ème} colloque du club des Bactéries Lactiques, 27-29 octobre 2010, Nancy, France.

Noura KECHAOU, Florian CHAIN, Jean-Jacques GRATADOUX, Chantal BRIDONNEAU, Edith HONVO-HOUETO, Claire CHERBUY, Luis BERMUDEZ-HUMARAN, Philippe LANGELLA, Sélection de souches probiotiques à propriétés immuno-modulatrices et/ou anti-oxydantes, Journées de l'école doctorale ABIES, 17-18 mars, 2009, AgroParisTech Paris, France

Publications

Noura Kechaou, Florian Chain, Jean-Jacques Gratadoux, Sebastien Blugeon, Nicolas Bertho, Christophe Chevalier, Ronan Le Goffic, Pascal Molimard, Jean Marc Chatel, Philippe Langella and Luis G. Bermúdez-Humarán. Identification of novel probiotic strains using large scale screening of immunomodulatory properties of lactic acid bacteria: validation in a murine model of influenza virus infection. En préparation, pour soumission dans « Applied and Environmental Microbiology »

Noura Kechaou, Florian Chain, Bruno Ebel, Guillaume Lemetais, Patricia Ramos, Laurent Beney, Rémy Cachon, Patrick Gervais, Jean-Marc Chatel, Luis Bermudez and Philippe Langella. Search of novel antioxidative probiotic lactic acid bacteria strains using *in vitro* and *in vivo* methods. En préparation, pour soumission dans « Applied and Environmental Microbiology »

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation des TLR et de leurs ligands.....	20
Figure 2 : Activation de la voie de signalisation NF- κ B.....	22
Figure 3 : Conséquences de l'activation de la réponse immunitaire adaptative	26
Figure 4 : Complémentarité de l'immunité innée et adaptative	27
Figure 5 : A. Structures de l'épithélium intestinal et B. Structure de l'épithélium colique.....	29
Figure 6 : Fonctions du microbiote intestinal.....	31
Figure 7: Vue générale du système immunitaire intestinal	31
Figure 8 : Tissus impliqués dans la réponse immunitaire du GALT	32
Figure 9 : Représentation schématique du NALT	35
Figure 10: Arbre de décision pour évaluer le statut QPS d'une souche bactérienne	40
Figure 11: Récapitulatif des aspects généraux, technologiques et fonctionnels à étudier pour l'identification de nouvelles souches probiotiques	43
Figure 12: Paramètres à respecter lors de la production de produits probiotiques.....	44
Figure 13: Répartition bactérienne dans le TD, genres bactériens retrouvés et stress rencontrés par les bactéries	46
Figure 14: Schéma représentant le microbiote avant et après un traitement antibiotique.....	48
Figure 15: Schéma représentant l'interaction des bactéries avec les cellules de l'hôte	49
Figure 16: Inhibition de la voie de signalisation NF- κ B par les bactéries commensales	50
Figure 17: Schéma représentant la cascade de réactions induites par l'arrivée d'une bactérie au niveau de l'épithélium intestinal	51
Figure 18: Schéma représentant les effets bénéfiques d'une bactérie probiotique au niveau de l'épithélium intestinal.....	52
Figure 19: Mécanismes d'action possibles des bactéries probiotiques	54
Figure 20: A. Coupes histologiques de côlons de souris saines ou B. traitées au DSS	65
Figure 21 : Protocole mis en place pour l'étude des résistances aux stress des souches de la collection	87
Figure 22 : Méthode de calcul du retard d'entrée en phase exponentielle pour les bactéries stressées.....	88
Figure 23 : Protocole <i>in vivo</i> de l'infection virale par le virus de la grippe.....	89
Figure 24 : Protocole de la colite murine induite au DSS	92
Figure 25 : Protocole de l'étude des propriétés anti-oxydantes des bactéries chez la souris ...	95
Figure 26 : Principe du test KRL	97
Figure 27 : Classement des souches selon le ratio IL-12p70/IL-10	102
Figure 28 : Classement des souches selon le pourcentage de variation d'IL-8.....	102
Figure 29 : Criblage des souches sélectionnées avec 5 donneurs de PBMC différents	104
Figure 30 : Retards d'entrée en phase exponentielle pour les souches de la collection après stress au peroxyde d'hydrogène	107
Figure 31 : Retards d'entrée en phase exponentielle pour les souches de la collection après stress aux SB	107
Figure 32 : Variation des poids des souris après infection virale à 2000 PFU	111

Figure 33 : Variation des poids des souris après infection virale à 200 PFU	111
Figure 34 : Variation des poids des souris après infection virale à 20 PFU	112
Figure 35 : Variation des poids des souris après infection virale à 100 PFU	113
Figure 36 : Scores visuels des souris à J0 et J10	114
Figure 37 : Charges virales dans les poumons des souris à J10 et J14 post-infection virale .	115
Figure 38 : Variations des poids des souris BALB/c à partir de J0 et jusqu'à J7	120
Figure 39 : Variations du DAI des souris BALB/c à partir de J0 et jusqu'à J7	120
Figure 40 : Scores macroscopiques sur les côlons des souris BALB/c	121
Figure 41 : Scores histologiques sur les côlons des souris BALB/c	122
Figure 42: Variations des poids des souris C57BL/6 à partir de J0 et jusqu'à J7	123
Figure 43 : Variations du DAI des souris C57BL/6 à partir de J0 et jusqu'à J7	123
Figure 44 : Scores macroscopiques sur les côlons des souris C57BL/6	124
Figure 45 : Scores histologiques sur les côlons des souris C57BL/6	125
Figure 46: Propriétés anti-oxydantes globales (KRL sur les sangs congelés) pour les différents lots de souris	129
Figure 47 : Propriétés anti-oxydantes globales (test KRL sur les foies) pour les différents groupes de souris	130
Figure 48 : Peroxydation lipidique par quantification du MDA dans les foies pour les différents groupes de souris	131
Figure 49 : Rapport GSSG/GSH pour les différents lots de souris	131
Figure 50: Valeurs GSSG/total et GSH/total dosées dans les foies pour les différents lots de souris	132

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Différentes fonctions des TLR	21
Tableau 2 : Récapitulatif des fonctions des cytokines	25
Tableau 3: Exemple de souches probiotiques disponibles sur le marché international.	37
Tableau 4 : Liste des bactéries reconnues pour leur statut QPS.....	41
Tableau 5 : Différentes conditions d'études de souches bactériennes dans des modèles d'infection virale chez la souris.	60
Tableau 6: Différentes conditions d'études de souches bactériennes dans des modèles d'inflammations intestinales chez la souris.....	67
Tableau 7 : Composition de la collection bactérienne et conditions de culture	83

AVANT-PROPOS

Ma thèse s'insère dans le cadre d'un projet appelé PROBIOTIQUE dont l'objectif est la mise au point de nouveaux produits fonctionnels avec des effets probiotiques immuno-modulateurs et/ou antioxydants pour les filières déshydratées et hydratées. Ce projet a été déposé par le pôle de compétitivité VITAGORA et est financé par le Fonds Unique Interministériel (FUI). Le consortium de ce projet est composé de deux partenaires industriels : Senoble (coordinateur), et Merck Médication Familiale, ainsi que de deux partenaires académiques : le laboratoire GPMA de l'ENSBANA de Dijon et l'équipe ProbiHôte de l'Institut MICALIS de l'INRA de Jouy en Josas. L'objectif final du projet est la mise sur le marché de i) laits fermentés nature/fruités avec effet probiotique immuno-modulateur, ii) laits fermentés nature/fruités avec effet probiotique anti-oxydant et iii) complément alimentaire avec effet probiotique immuno-modulateur.

Ce projet a financé ma thèse, deux autres thèses CIFRE avec les deux industriels mentionnés et un poste d'ingénieur de recherche sur une durée de 36 mois dans notre équipe. La liste des participants au projet est présentée dans le tableau ci-dessous.

Structure	Type	Nom	Prénom	Fonction
MERCK MEDICATION FAMILIALE	Groupe Industriel	NOBLET	Marc	Responsable R&D
		MOLIMARD	Pascal	Development Manager
SENOBLE	Groupe Industriel	FALCONNIER	Patrick	Directeur Innovation-Qualité et Stratégie Industrielle
		RAMOS	Patricia	Responsable Scientifique
ENSBANA	Laboratoire GPMA	GERVAIS	Patrick	Professeur / Directeur du Laboratoire GPMA
		BENEY	Laurent	Maître de Conférences
		CACHON	Rémy	Professeur
		EBEL	Bruno	Doctorant (thèse CIFRE)
		LEMETAIS	Guillaume	Doctorant (thèse CIFRE)
INRA	Equipe ProbiHôte de l'Institut MICALIS	LANGELLA	Philippe	Directeur de Recherche, responsable de l'équipe "Interactions des Bactéries Commensales et Probiotiques avec l'Hôte" MICALIS INRA (UMR1319) et AgroParisTech Domaine de Vilvert – bâtiment 440 78352 Jouy-en-Josas, cedex
		CHATEL	Jean Marc	Chargé de recherche, responsable adjoint de l'équipe ProbiHôte
		BERMUDEZ	Luis	Chargé de recherche
		CHAIN	Florian	Ingénieur de recherche
		KECHAOU	Noura	Doctorante

INTRODUCTION

Dans ce chapitre bibliographique, nous allons d'abord présenter les réponses immunitaires ainsi que les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Ces éléments nous permettront de mieux comprendre les parties suivantes concernant les probiotiques et leurs utilisations en santé.

I. LES REPOSES IMMUNITAIRES

Les mammifères fournissent un grand nombre de niches qui peuvent être colonisées par des microorganismes. La colonisation par ces microorganismes peut être bénéfique (cas du microbiote intestinal qui sera présenté par la suite) ou délétères lorsque les microorganismes sont pathogènes. Le système immunitaire des mammifères possède des composants impliqués soit dans la réponse immunitaire innée, soit dans la réponse immunitaire adaptative, qui coopèrent pour tolérer les bactéries non pathogènes et protéger l'hôte contre les infections microbiennes.

1. Immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense pour lutter contre les microorganismes pathogènes, et fait intervenir différents acteurs. Cette réponse immunitaire est rapide et sans mémoire. Elle est non spécifique d'une majeure partie des microbes rencontrés grâce à des effecteurs présents dans l'organisme bien avant l'infection. Elle fait intervenir des cellules immunitaires, mais aussi des molécules telles que le lysozyme, les interférons, et les composants du complément (Takeda and Akira 2005; Kanneganti, Lamkanfi et al. 2007).

1.1. Barrières anatomiques

Les surfaces des muqueuses (intestinales, respiratoires, génitales...) jouent un rôle de barrière contre les microorganismes pathogènes. La barrière physique est constituée de cellules épithéliales empêchant le développement bactérien, la barrière chimique implique la production d'enzymes et de peptides antimicrobiens et la barrière biologique est constituée par la présence de différentes bactéries. Dans la muqueuse intestinale par exemple, l'un des effets « barrières » est constitué par le mucus qui est capable d'emprisonner les éléments étrangers et de les éliminer. A ce niveau, il y a aussi production de substances

antimicrobiennes pour lutter contre les pathogènes (Preidis and Versalovic 2009; Forsythe and Bienenstock 2010; Bron, van Baarlen et al. 2011).

1.2. Cellules immunitaires

Il existe une grande variété de types cellulaires immunitaires dont la plupart peuvent être classées en deux groupes : cellules phagocytaires et cellules non phagocytaires. La phagocytose étant l'internalisation d'un microorganisme étranger (après sa reconnaissance) et la formation d'un phagosome. Les cellules phagocytaires regroupent les macrophages, les neutrophiles, les monocytes circulants et les cellules dendritiques (CD). Elles sont aussi appelées cellules présentatrices de l'antigène (CPA). En plus de leur rôle important dans l'élimination des microbes, ces cellules sont cruciales dans l'initiation de la réponse adaptative. En effet, après avoir reconnu le pathogène et capturé son antigène (Ag), les CPA migrent vers les tissus lymphoïdes et présentent les Ag dégradés en peptides aux lymphocytes T (LT) CD4 auxiliaires qui permettront d'activer la réponse immunitaire adaptative.

Les cellules non phagocytaires sont des cellules qui contiennent des granules. Elles regroupent les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes, et les cellules « natural killer » (NK). Au contact des microbes ou des cellules infectées, ces cellules libèrent des granules contenant des molécules impliquées dans l'inflammation comme les peptides anti-microbiens, les lysozymes et les cytokines.

Les cellules épithéliales et endothéliales ne sont pas considérées comme des cellules de l'immunité innée, mais elles jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire innée car elles reconnaissent les microorganismes grâce à des récepteurs.

1.3. Reconnaissance des bactéries

La réponse immunitaire démarre par la reconnaissance d'un microorganisme étranger par le biais de récepteurs moléculaires présents chez l'hôte, appelés Pattern Recognition Receptor (PRR) (Kanneganti, Lamkanfi et al. 2007).

Les PRR, exprimés en particulier par les cellules myélo-monocytaires et les cellules épithéliales, reconnaissent des motifs microbiens conservés appelés Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMP) ou Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) dans le cas des pathogènes (Abreu 2010). Les motifs microbiens conservés regroupent des composants de la paroi cellulaire bactérienne tels que les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes (PEG), les acides lipotéchoïques (LTA) des parois bactériennes, mais aussi les acides nucléiques bactériens tels que les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien et l'ARN

double brin de certains virus. Les PRR sont regroupés en grande famille : Toll-Like Receptors (TLR), NOD-Like Receptors (NLR), RIG-I-Like Receptors (RLR) et C-lectin-Like Receptors (CLR) (Kanneganti, Lamkanfi et al. 2007). Nous avons choisi de ne présenter que les TLR, qui sont les PRR les plus connus.

Actuellement, 10 TLR humains ont été identifiés TLR1-10 et 12 TLR murins TLR1-9 et TLR11-13 (Wolowczuk, Verwaerde et al. 2008; Wells 2011). Les TLRs sont des protéines transmembranaires avec un domaine extracellulaire se liant à son ligand et composé des Leucine-Rich Repeats (LRR). Il a été démontré que la liaison et la spécificité des TLR aux MAMPs est réalisée grâce à l'arrangement et la variation de séquence dans les domaines extracellulaires LRR. Les TLR peuvent être localisés à la surface cellulaire ou à la membrane des vacuoles/endosomes comme le montre la Figure 1 (Takeda and Akira 2004; Grabig, Paclik et al. 2006).

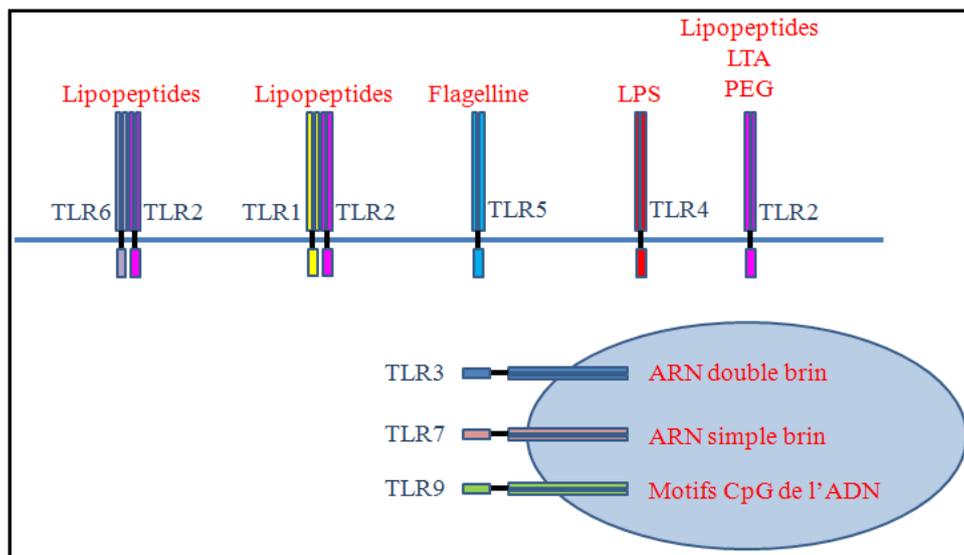


Figure 1 : Localisation des TLR et de leurs ligands

Les TLR sont retrouvés à la surface des cellules de l'immunité innée et des cellules épithéliales et endothéliales. Chaque TLR en homo-dimère ou en hétéro-dimère reconnaît un ou plusieurs MAMP, comme décrit dans le Tableau 1 (Takeda and Akira 2004; Takeda and Akira 2005).

Tableau 1 : Différentes fonctions des TLR

TLR	Localisation	Ligand
TLR2	Surface cellulaire	Lipopeptides microbiens acide lipotéichoïque (LTA) PEG
TLR2/TLR1 TLR2/TLR6	Surface cellulaire	Lipopeptides (triacyls et diacyls)
TLR3	Intracellulaire	ARN double brin
TLR4	Surface cellulaire Intracellulaire	LPS
TLR5	Surface cellulaire	Flagelline
TLR7	Intracellulaire	ARN simple brin
TLR8	Intracellulaire	ARN simple brin
TLR9	Surface cellulaire Intracellulaire	Motifs CpG de l'ADN

L'activation des TLR conduit à l'interaction de leurs domaines intracellulaires très conservés Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR), avec des molécules adaptatrices telles que « Myeloid Differentiation primary response gene » 88 (MyD88), conduisant ainsi à la transduction d'un signal (Takeda and Akira 2004).

Les complexes TLR-ligand activent une multitude de voies de signalisations intracellulaires conduisant à l'activation de facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire kappa-B (NF- κ B, « Nuclear Factor kappa-B ») montré dans la Figure 2. Ce dernier induit la transcription de gènes codant pour des médiateurs de l'immunité comme des peptides antimicrobiens, des chimiokines et des cytokines (Magalhaes, Tattoli et al. 2007; Medzhitov 2007).

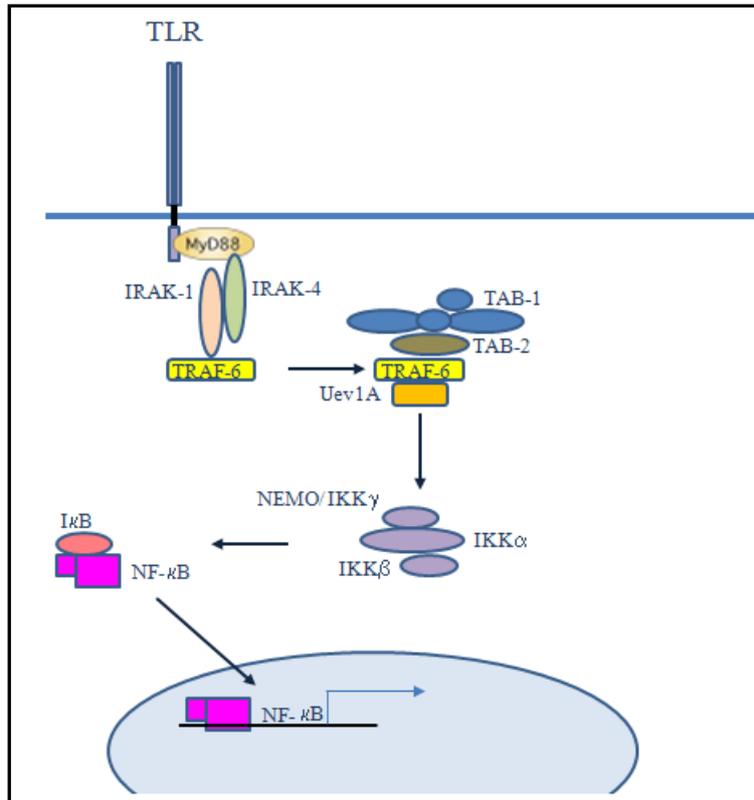


Figure 2 : Activation de la voie de signalisation NF-κB

1.4. Cytokines

Les cytokines sont des protéines ou des glycoprotéines, produites par une cellule et agissant sur une autre. Toutes les cellules à l'exception des érythrocytes, sont capables de synthétiser des cytokines et de répondre à celles-ci. Elles permettent aux cellules de l'immunité de communiquer à proximité mais aussi à distance du site infectieux. Les cytokines sont des régulateurs des défenses de l'hôte contre les pathogènes. Elles participent à l'induction de la prolifération et de la différenciation des cellules hématopoïétiques ainsi qu'à la régulation et à la détermination de la nature des réponses immunes. Elles sont généralement sécrétées et agissent en tant que médiateurs solubles (Dinarello 2007).

La majorité des cytokines présentent quatre caractéristiques communes :

- Pléiotropie : les cytokines ont des effets diversifiés, dirigés vers plusieurs populations cellulaires,
- Redondance : plusieurs cytokines peuvent agir sur le même type cellulaire pour induire des activités biologiques similaires,

- Effet à faible dose : les cytokines agissent à de très faibles concentrations, de l'ordre du nanomolaire,
- Effet cascade : les cytokines sécrétées successivement, agissent généralement en synergie, et sont souvent régulées par d'autres cytokines inhibitrices ou des récepteurs solubles. Une cytokine peut induire ou inhiber la production d'autres cytokines (Dinarello 2007).

Sous le terme « cytokines » sont regroupés les interleukines (IL), les facteurs de croissance mésenchymateux, la famille des « Tumor Necrosis Factor » (TNF), les interférons et la famille des chimiokines. Les cytokines se lient à des récepteurs spécifiques sur la surface des cellules cibles et initient des cascades de signalisation intracellulaire. La plupart des cytokines sont des facteurs de différenciation et/ou de croissance. Les cytokines peuvent être divisées en grands groupes selon la structure de leurs récepteurs ou elles peuvent être séparées en plusieurs classes selon leurs fonctions biologiques (Akdis, Burgler et al. 2011).

Les cytokines pro-inflammatoires comme les TNF- α et l'IL-1 permettent une initiation rapide de la réponse inflammatoire. La réponse sera amplifiée principalement grâce à l'IFN- γ qui active les fonctions pro-inflammatoires des macrophages, en induisant par exemple la sécrétion d'IL-6. Ces cytokines pro-inflammatoires présentent différentes fonctions telles que la vasodilatation des vaisseaux sanguins, l'adhésion des leucocytes (granulocytes, monocytes et lymphocytes présents dans le sang) aux cellules endothéliales et l'augmentation de la réponse cytokinique des cellules épithéliales et endothéliales (Kushner and Rzewnicki 1994).

Les cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10, permettent de contrôler l'inflammation et induisent la diminution de la sécrétion des cytokines TNF- α et l'IL-1 par les macrophages et de bloquer leurs fonctions antibactériennes. Elles ont aussi pour rôle de déclencher la réparation des tissus abîmés après l'inflammation (Saraiva and O'Garra 2010).

Les cytokines angiogéniques, dont l'IL-6, permettent la néo-vascularisation et participent au processus de réparation des tissus abîmés lors d'une infection (Frantz, Vincent et al. 2005).

Le terme chimiokine provient de « chimiotaxie » et « cytokine ». Les chimiokines telles que IL-8 et « Monocyte Chemoattractant Protein-1 » (MCP-1) ou encore « Macrophage Inflammatory Protein-1 α » (MIP-1 α) permettent le recrutement des cellules de l'immunité innée possédant les récepteurs appropriés aux sites d'inflammation. Elles peuvent aussi

participer à la néo-vascularisation ou posséder des activités antimicrobiennes (Eliasson and Egesten 2008).

Les interférons sont classés selon leurs récepteurs cellulaires. Il existe i) des interférons de type I tels que IFN- α/β qui ont un rôle essentiel dans la réponse antivirale en induisant l'apoptose des cellules infectées, ii) un seul interféron de type II, l'IFN- γ qui active principalement les macrophages et induit la sécrétion de facteurs antimicrobiens et iii) un interféron de type III, l'IFN- λ . Tous les interférons, après activation de leurs récepteurs, induisent la transcription de plus d'une centaine de gènes, les « IFN-stimulated genes », qui peuvent être spécifiques d'un type d'interféron ou commun, et dont les protéines correspondantes ont des fonctions très diverses (Takaoka and Yanai 2006).

Les « Colony-Stimulating Factors » (CSF) sont des facteurs de croissance, de prolifération et de différenciation des cellules de l'immunité comme les macrophages, les CD ou encore les granulocytes. Ils permettent de remplacer les cellules immunitaires détruites (Wakefield, James et al. 1990).

Certaines cytokines ont un rôle très important dans la connexion entre les réponses immunitaires innées et adaptatives. En effet, elles ont des fonctions de croissance des lymphocytes menant à une réponse Th1 (immunité cellulaire) ou Th2 (immunité humorale) et à leur amplification. Il existe une autre réponse T impliquant les cellules Th17 qui produisent IL-17, IFN- γ et IL-23. Ces cellules inflammatoires sont impliquées dans les réponses auto-immunes, dans le contrôle de l'infection et dans l'interaction avec le microbiote (Korn, Bettelli et al. 2009; Littman and Rudensky 2010). Les fonctions des cytokines sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Récapitulatif des fonctions des cytokines

Fonction	Propriétés	Autres effets	Exemples
Facteurs de croissance	expansion clonale	polarisation Th1/Th2/Th17	IL-2, IL-4, IL-7, IL-17, IL-15
Cytokines Th1	↑ réponse Th1	expansion clonale des CLT	IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-
Cytokines Th2	↑ réponse Th2	↑ production des anticorps	IL-4, IL-5, IL-18, IL-25, IL-33
Cytokines Th17	↑ réponse Th17, IFN- γ	réponses auto-immunes	IL-17, IL-23, IFN- γ
Cytokines pro-inflammatoires	↑ médiateurs inflammatoires	↑ réponses immunité innée	IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-18, IL-23, IL-32
Cytokines anti-inflammatoires	↓ gènes inflammatoires	↓ maladies auto-immune	IL-10, IL-13, TGF- β , IL-22, IFN- α/β
Adipokines	pro-inflammatoires	pro-athérogéniques	IL-1 α , TNF- α , IL-6
Osteoclast-activating cytokines	resorption des os	stimulation immunitaire	RANKL
Colony-stimulating factors	hématopoïèse	pro et anti-inflammatoire	IL-3, IL-7, G-CSF, GM-CSF, M-CSF
Cytokines angiogéniques	néo-vascularisation	pro-métastatique	IL-1, IL-6, IL-8
Facteurs de croissance mésenchymateux	fibrose	pro-métastatique	TGF- β , FGF, HGF, BMP
IFN de type II	activation des macrophages	↑ CHM classe II	IFN- γ
IFN de type I	anti-virale, ↑ CHM classe I	anti-inflammatoire anti-angiogénique	IFN- α , IFN- β
Chimiokines	↑ migration cellulaire	↑ activation cellulaire	IL-8, MCP-1, MIP-1 α

2. Immunité adaptative

Ce type d'immunité se développe en réponse à une infection et s'adapte pour reconnaître et éliminer un pathogène étranger puis pour mémoriser le premier contact avec ce pathogène. Cette réponse est décalée dans le temps par rapport à l'immunité innée ; elle permet d'éliminer les pathogènes qui ont échappé ou persisté à la réponse immunitaire innée. Elle est plus lente que l'immunité innée et peut être soit humorale, soit cellulaire. Les cellules impliquées dans cette immunité sont les lymphocytes B (LB) et LT (Akira, Takeda et al. 2001).

Au contact d'un Ag, un LB se différencie en cellules B mémoires et cellules B effectrices ou plasmocytes. Les LB mémoires ont une durée de vie plus importante que les cellules B naïves et expriment toujours le même anticorps (Ac) membranaire que les cellules B naïves dont elles sont issues. Les plasmocytes quant à eux produisent abondamment les Ac sous une forme sécrétée, qui se lie à l'Ag pour former des complexes immuns. Ces complexes participent à la phagocytose des pathogènes conduisant à leur destruction.

Les LT se différencient en LT CD4+ et LT CD8+ cytotoxiques suite à leur stimulation par les CD comme montré dans la Figure 3. Les LT CD8+ cytotoxiques détectent et dégradent les agents pathogènes présents dans les cellules de l'hôte. Les LT CD4+ induisent des réponses immunitaires de type Th1, Th2, Th17 ou Treg (Figure 3) : i) la réponse Th1 induit la production de cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et IL-12, ii) la réponse Th2 induit la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et participe aux défenses contre les parasites, iii) la réponse Th17 régule la production d'IL-17 et IL-22 pour lutter contre les bactéries extracellulaires et iiiii) la réponse Treg induit la production de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β (Medzhitov 2007; Akdis, Burgler et al. 2011).

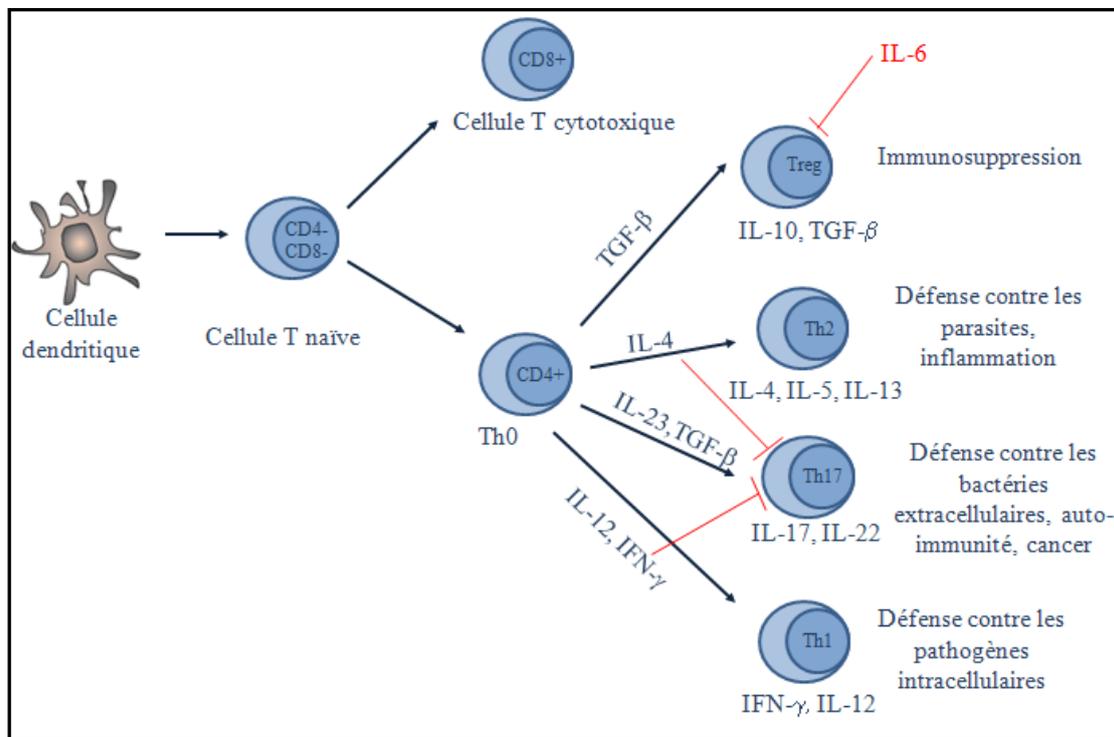


Figure 3 : Conséquences de l'activation de la réponse immunitaire adaptative

Les réponses immunitaires innée et adaptative, grâce à leurs différences, travaillent en complémentarité pour la lutte contre les pathogènes (Figure 4).

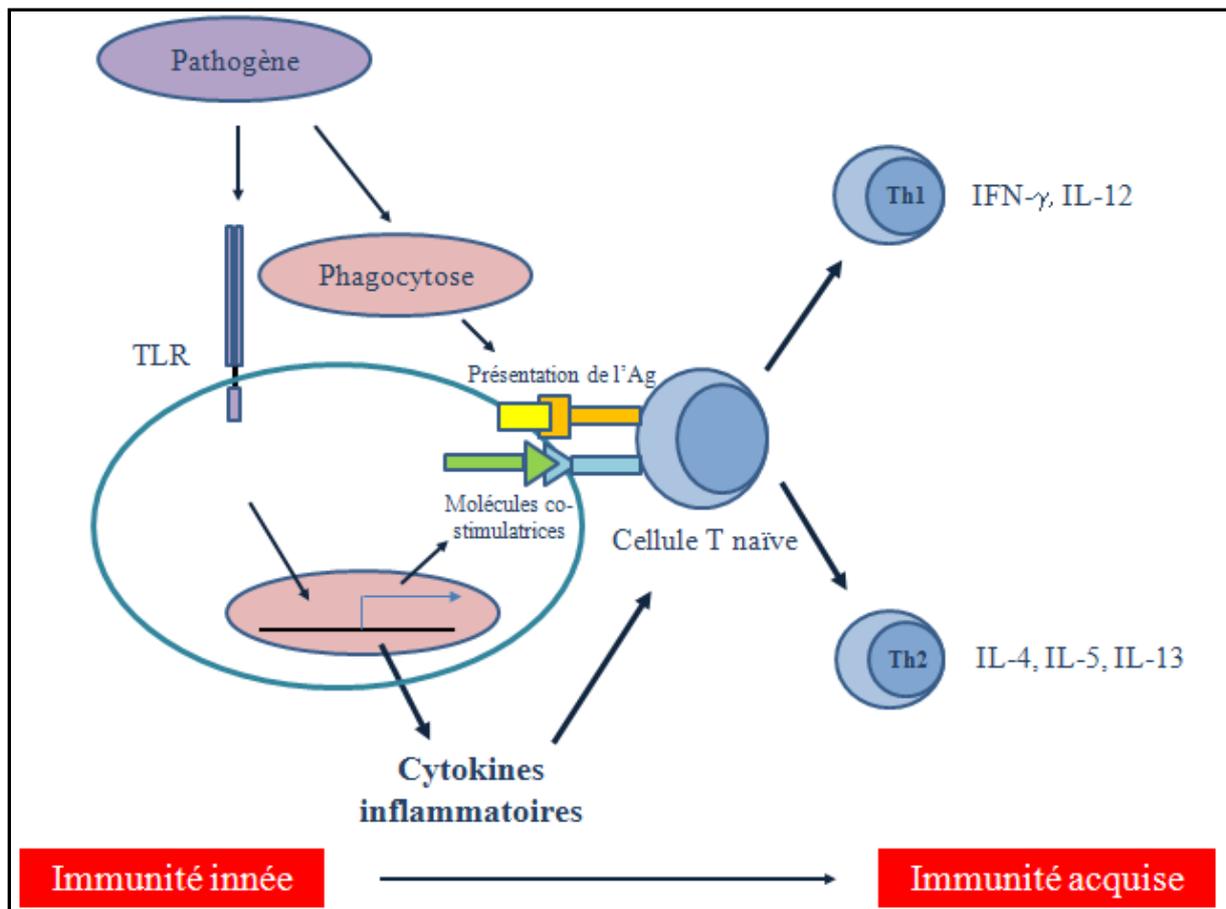


Figure 4 : Complémentarité de l'immunité innée et adaptative

Les cellules de l'immunité innée, comme les CD et les macrophages, phagocytent les pathogènes et présentent l'Ag aux cellules T naïves. De plus, la reconnaissance par les TLR du pathogène induit la production de molécules co-stimulatrices et de cytokines inflammatoires. Il résulte de ces deux actions le développement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique de l'Ag et le déclenchement des réponses Th1 et Th2 (Takeda and Akira 2004).

II. Les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse MALT

Les muqueuses sont des couches de cellules revêtant la paroi interne d'organes creux tels que le tube digestif, les bronches, les organes génitaux ou la bouche. Elles sont en permanence humidifiées et sont assez perméables à l'eau et à d'autres substances. Elles ont aussi la particularité de sécréter du mucus.

Les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse sont plus connus sous le nom de « Mucosa-Associated Lymphoid Tissue » (MALT), ils font partie des organes lymphoïdes secondaires retrouvés dans différents sites du corps humain comme dans le tractus intestinal appelé « Gut-Associated Lymphoid Tissue » (GALT) ou le nez nommé « Nasal-Associated Lymphoid Tissue » (NALT) ou au niveau des bronches « Bronchus-Associated Lymphoid Tissue », mais aussi dans le larynx « Larynx-Associated Lymphoid Tissue » ou le long de la peau « Skin-Associated Lymphoid Tissue ». Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéresserons seulement au GALT et au NALT.

1. Les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale GALT

Le tractus intestinal est la plus grande muqueuse de l'hôte. La surface du GALT représente ainsi environ 100 m². Après une présentation générale du GALT, nous nous intéresserons à sa colonisation par les bactéries, ainsi qu'aux cellules immunitaires qui y sont produites.

1.1. Présentation générale

Anatomiquement, le système digestif comporte successivement la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le gros intestin (caecum et côlon) et le rectum. Le tractus intestinal constitue un tube composé de trois couches de tissu : la couche extérieure contient plusieurs feuilles de muscles lisses innervés, spécialisés dans le péristaltisme, la couche intermédiaire se compose de tissu stromal ; la surface interne est constituée de cellules épithéliales cuboïdales qui transforment, absorbent les nutriments et compactent les selles.

L'intestin grêle est arbitrairement divisé en duodénum, jéjunum et l'iléon. Sa surface d'absorption est considérablement augmentée par de nombreuses saillies lumineuses, appelées villosités, et invaginations dans la sous-muqueuse, les cryptes de Lieberkühn (Figure 5A).

Les villosités sont tapissées de différents types cellulaires dont les entérocytes (qui absorbent les nutriments), les cellules caliciformes (qui protègent l'intestin contre les sucs gastriques), les cellules neuroendocrines (qui secrètent des hormones) et les cellules M (qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire). Les cryptes sont tapissées de cellules caliciformes, de cellules neuroendocrines, d'entérocytes et de cellules de Paneth. Ce dernier type cellulaire réside dans la partie inférieure des cryptes, où elles produisent des lysozymes, des peptides antimicrobiens et des défensines qui seront déversées dans la lumière des cryptes pour renforcer l'effet barrière de la muqueuse intestinale. Au fond des cryptes se trouvent des cellules souches qui prolifèrent en cellules filles et se différencient en migrant vers l'extrémité supérieure des villosités (Sancho, Batlle et al. 2004; Abreu 2010).

Dans la muqueuse colique, l'épithélium de surface est plat. Il est constitué de colonocytes (qui absorbent l'eau et les électrolytes), de cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines. Il présente aussi une différence structurale avec l'épithélium intestinal puisqu'on ne retrouve pas de villosités, et seules les cryptes sont présentes (Figure 5B). Ces cryptes ne contiennent pas de cellules de Paneth et elles produisent seulement des cellules souches (Sancho, Batlle et al. 2004).

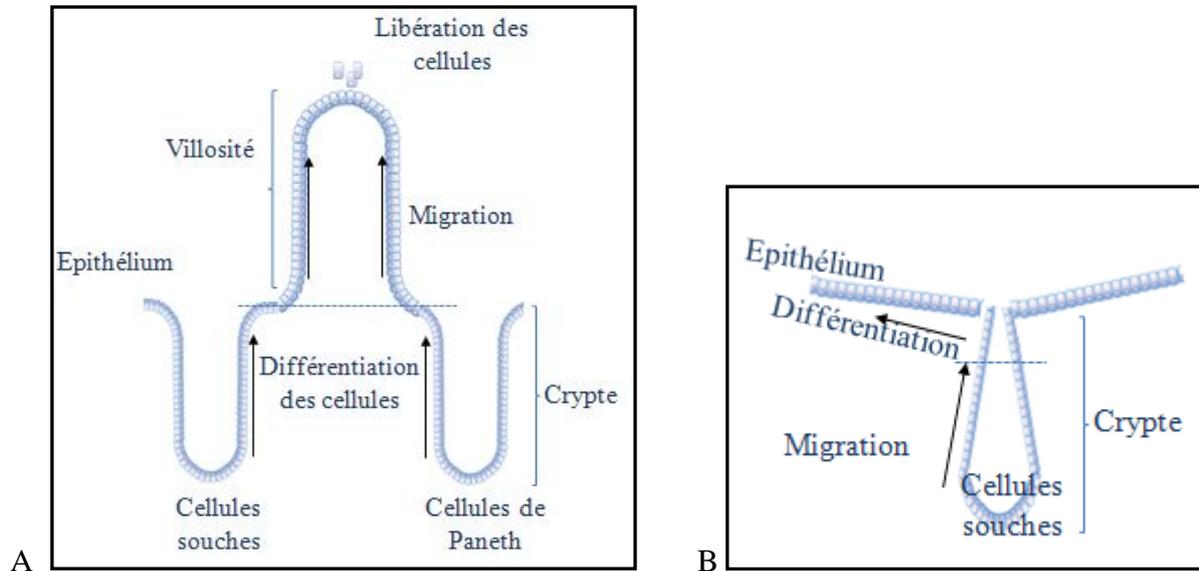


Figure 5 : A. Structures de l'épithélium intestinal et B. Structure de l'épithélium colique

1.2. Colonisation bactérienne

Le tube digestif du nouveau-né est stérile à la naissance, puis il est rapidement colonisé par une communauté microbienne d'origine maternelle (lorsque la naissance se fait par voie basse) et environnementale (dont le lait maternel). Cette communauté microbienne constituée d'un nombre restreint d'espèces bactériennes (avec dominance des bifidobactéries et des bactéroïdes), se complexifie ensuite progressivement sous l'influence de multiples facteurs dont l'alimentation, avec une importante diversification au moment du sevrage et de l'introduction d'aliments solides. C'est vers l'âge de 2 ans qu'un équilibre microbien s'installe, le profil du microbiote devenant mature (Isolauri, Salminen et al. 2004).

Le microbiote intestinal est la nouvelle dénomination de la microflore intestinale. Il correspond à l'ensemble des microorganismes vivant dans le tractus digestif (TD). Chez l'homme, le microbiote intestinal est composé de 100 000 milliards de bactéries soit 10 à 100 fois le nombre de cellules de notre organisme. Les 1000 espèces bactériennes composant le microbiote intestinal dominant d'un individu adulte vivent en commensalisme. Ces espèces ne sont pas réparties de façon homogène. En effet, la distribution des bactéries tout le long du TD suit un gradient croissant de l'estomac (conditions acides) au côlon (environnement anaérobie) en passant par le duodénum et l'iléon (Coudeyras and Forestier 2010; Arumugam, Raes et al. 2011). La grande stabilité du microbiote tout au long de la vie de l'hôte, est l'une de ses caractéristiques majeures : les populations bactériennes se renouvellent pratiquement « à l'identique » ; et il se reconstitue de même après un événement qui le bouleverse temporairement (phénomène de résilience) (Preidis and Versalovic 2009; Coudeyras and Forestier 2010; Gareau, Sherman et al. 2010).

Les principales fonctions du microbiote sont présentées dans la Figure 6. Elles regroupent i) des fonctions de protection incluant la production de composés anti-microbiens ii) des fonctions structurales avec renforcement de l'effet barrière et participation au développement du système immunitaire et iii) des fonctions métaboliques en fermentant les résidus alimentaires non digérés et en produisant des acides gras à chaîne courte (AGCC) essentiels à l'hôte (Isolauri, Salminen et al. 2004).

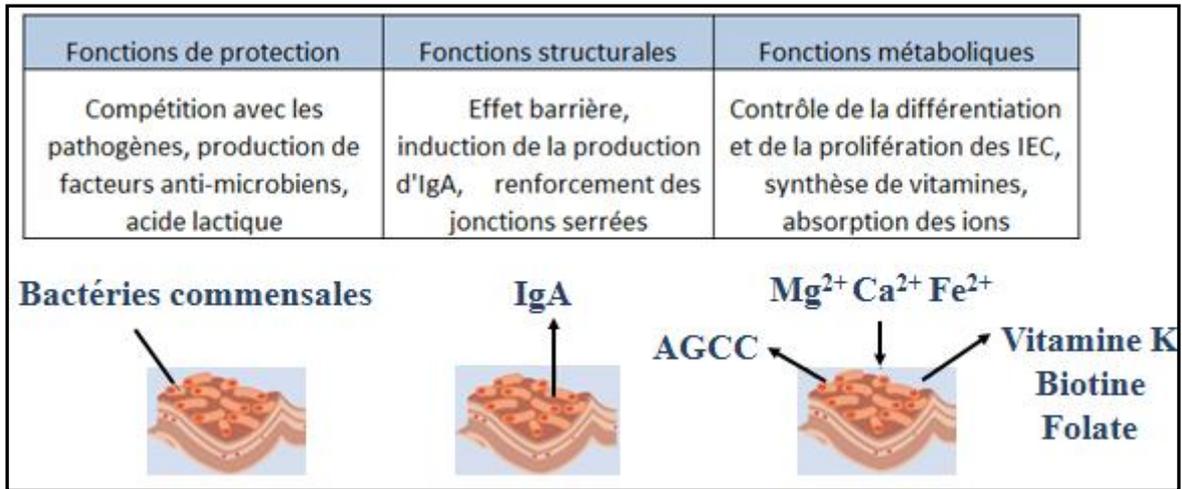


Figure 6 : Fonctions du microbiote intestinal

1.3. Cellules immunitaires

Une vue générale (Figure 7) du système immunitaire intestinal permet de découvrir son architecture particulière montrant des bactéries dans la lumière intestinale et des cellules immunitaires dans la lamina propria, séparées par une couche de mucus. Le GALT joue un rôle très important et complexe dans les défenses immunitaires de l'hôte car il assure à la fois la tolérance des bactéries commensales et l'induction de la réponse immunitaire en présence de bactéries pathogènes (Garrett, Gordon et al. 2010).

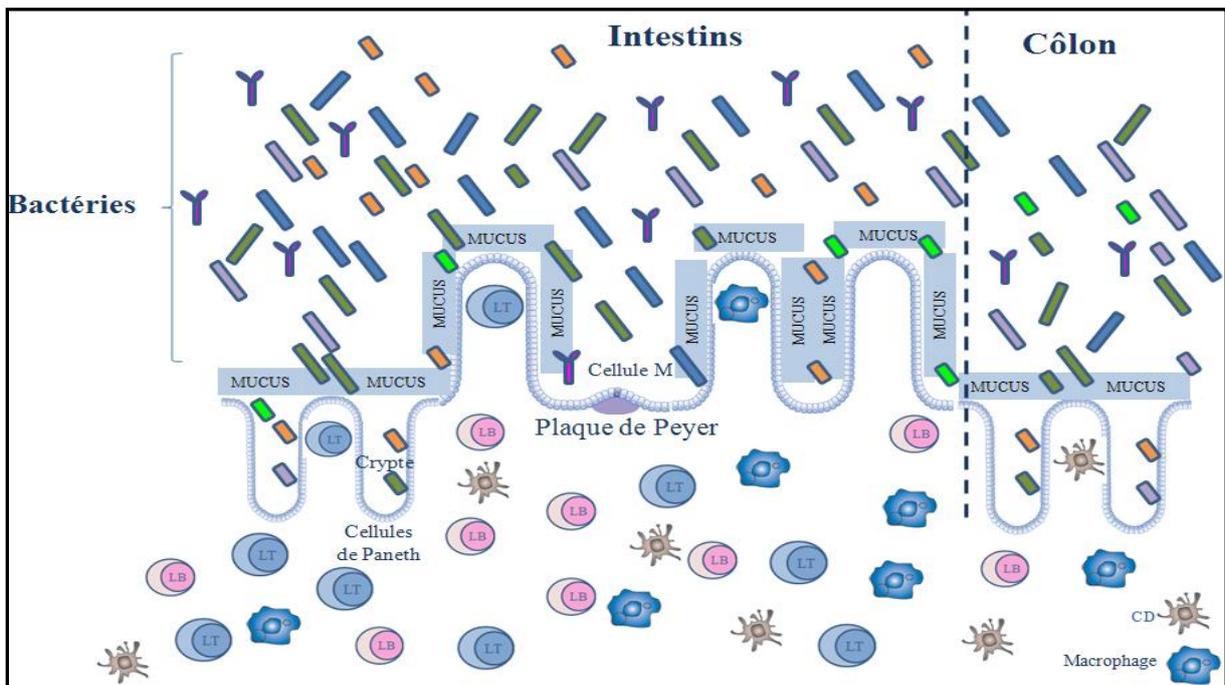


Figure 7: Vue générale du système immunitaire intestinal

Le GALT est composé de cellules effectrices telles que les LB, les LT, les macrophages et les CD circulant dans la lamina propria, et de tissus responsables de l'induction de la réponse immunitaire : les plaques de Peyer (PP), le nœud lymphatique mésentérique (MLN, « Mesenteric Lymph Node ») et les follicules lymphoïdes isolés comportant des cellules immunitaires (Figure 8). Ces tissus sont responsables, au niveau de l'intestin, de l'induction de la réponse immunitaire (Borchers, Selmi et al. 2009).

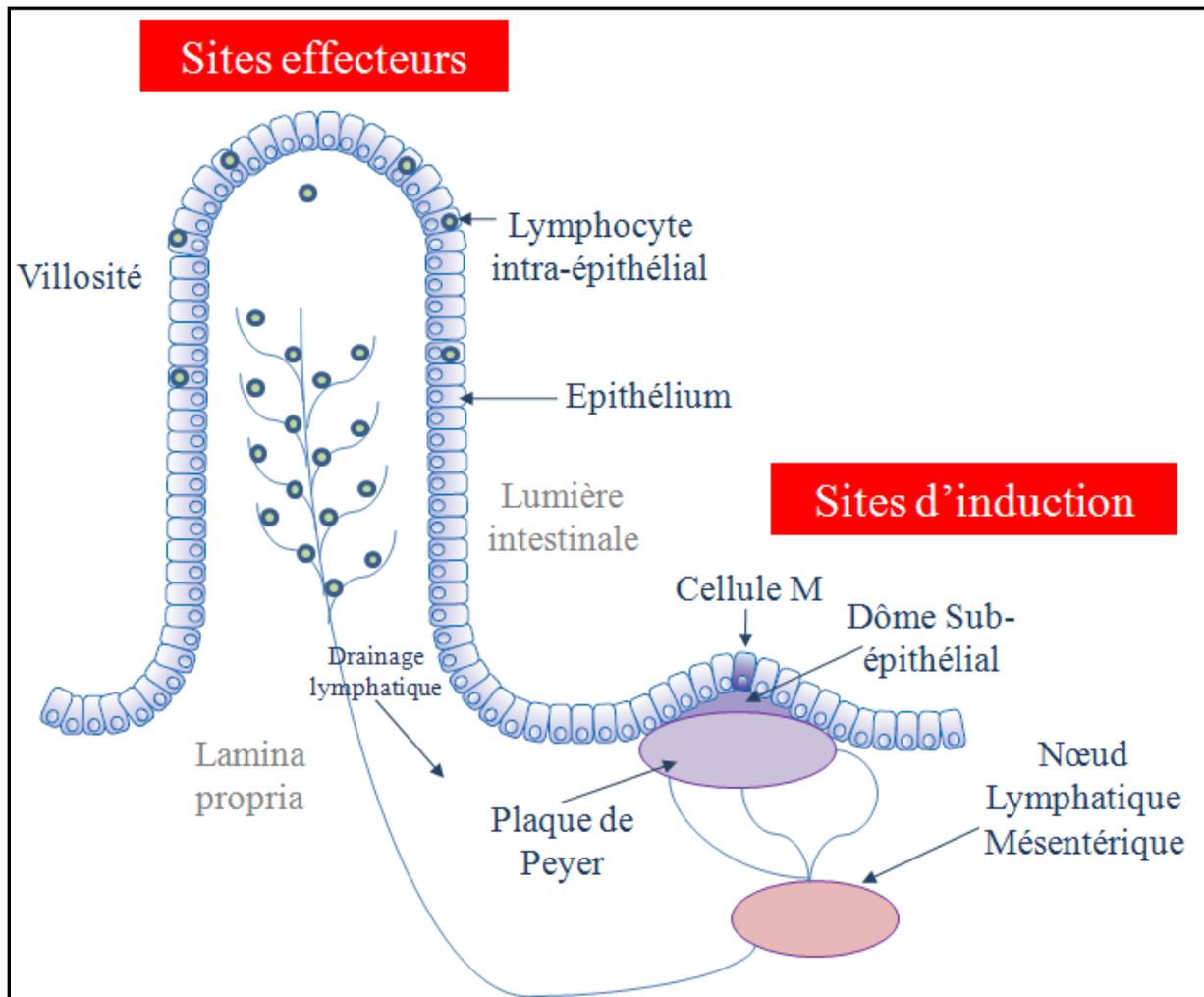


Figure 8 : Tissus impliqués dans la réponse immunitaire du GALT

Les PP sont situées principalement au niveau de l'intestin grêle. Elles sont constituées d'un dôme central comprenant des LB appelé « Sub-Epithelial Dome » (SED). Leur rôle est de piéger l'Ag et de le délivrer aux CPA. Les LB sont alors stimulées par la rencontre avec l'Ag et vont migrer vers les ganglions mésentériques où la réponse immunitaire est amplifiée. Un autre type cellulaire est retrouvé aussi au niveau de ces plaques, et plus précisément dans l'épithélium intestinal, les cellules M. Ces cellules à la forme particulière sont spécialisées

dans le transport des Ag, microorganismes et autres particules inertes présents dans la lumière intestinale jusqu'aux CD qui prendront le relais pour leur transport vers les tissus lymphoïdes. Les Ag induisent alors la différenciation des LB en plasmocytes, qui migrent le long de la sous-muqueuse en produisant les IgA au sein de la lumière intestinale (Borchers, Selmi et al. 2009; Abreu 2010).

2. Les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse nasale NALT

Tout comme la muqueuse intestinale, la muqueuse nasale est associée à des tissus lymphoïdes, le NALT. Après une présentation générale du NALT, nous nous intéresserons à sa colonisation par les bactéries, ainsi qu'aux cellules immunitaires qui y sont produites.

2.1. Présentation générale

Le NALT correspond chez l'homme aux anneaux de Waldeyer (amygdales palatines, amygdales pharyngées, amygdales linguales et végétations adénoïdes) et chez la souris à une paire de structures lymphoïdes situées dans la cavité nasale (Kiyono and Fukuyama 2004; Rangel-Moreno, Carragher et al. 2007). Chez la souris, contrairement au GALT dont le développement est initié durant la formation de l'embryon, le développement du NALT débute à la naissance et atteint sa maturité après 8 semaines. Chez l'homme, le NALT est présent chez le fœtus et se développe rapidement après la naissance (Bienenstock and McDermott 2005).

Le NALT, qui est un sous-type du MALT, est retrouvé principalement dans les tissus lymphoïdes du pharynx et de la gorge. Il participe activement au maintien de l'homéostasie de l'organisme en limitant l'entrée d'agents étrangers au niveau de ces deux sites. La muqueuse nasale est le premier site de contact des Ag étrangers inhalés. Ils sont stoppés par l'action des cellules épithéliales qui constituent une barrière physique à leur entrée dans l'organisme. L'action de ces cellules est renforcée par la présence du mucus (Bienenstock and McDermott 2005).

2.2. Colonisation bactérienne

Il n'y a presque pas de bactéries présentes dans le larynx et dans le tractus respiratoire inférieur (trachée, bronches et alvéoles pulmonaires). En revanche, il y a une colonisation bactérienne importante dans les narines et surtout le pharynx, estimée à 10^8 bactéries/ml de sécrétion pharyngée. Cette différence de colonisation est due à la présence d'une épaisse

couche protectrice de mucus et de cils vibratiles de l'épithélium du larynx qui chassent les microorganismes vers le pharynx. Ces mêmes conditions défavorables à la colonisation bactérienne sont présentes au niveau des sinus et des fosses nasales. Néanmoins, des espèces telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* sont capables de se développer dans le mucus (Coudeyras and Forestier 2010).

2.3. Cellules immunitaires

Même si le NALT est beaucoup moins bien caractérisé que le GALT, il apparaît que les structures lymphoïdes de ces deux tissus muqueux sont très similaires. Cependant, l'architecture du NALT (Figure 9) est différente de celle du GALT caractérisée principalement par l'absence des plaques de Peyer. L'épithélium du NALT se compose d'un grand nombre de cellules ciliées, de cellules prismatiques, de quelques cellules caliciformes et de cellules M. Les cellules M localisées dans le NALT ressemblent à leurs homologues intestinaux aussi bien par leur structure que par leur fonction (endocytose des antigènes et transport de ceux-ci aux tissus sous-jacents) (Karchev and Kabakchiev 1984).

La réponse immunitaire est aussi toujours induite suite à la capture de l'Ag par les cellules M situées dans les cellules épithéliales mucosales. L'infection virale des cellules stimule directement la production de cytokines (interférons), accompagnée de l'inhibition de la réplication virale et la prolifération cellulaire. La capacité des cellules NK à lyser les cellules infectées par le virus est également augmentée. Les macrophages et les CD absorbent les Ag et les dirigent vers les LT helper. Les LB et les LT seront alors stimulés (Csencsits, Jutila et al. 1999; Tutykhina, Logunov et al. 2011).

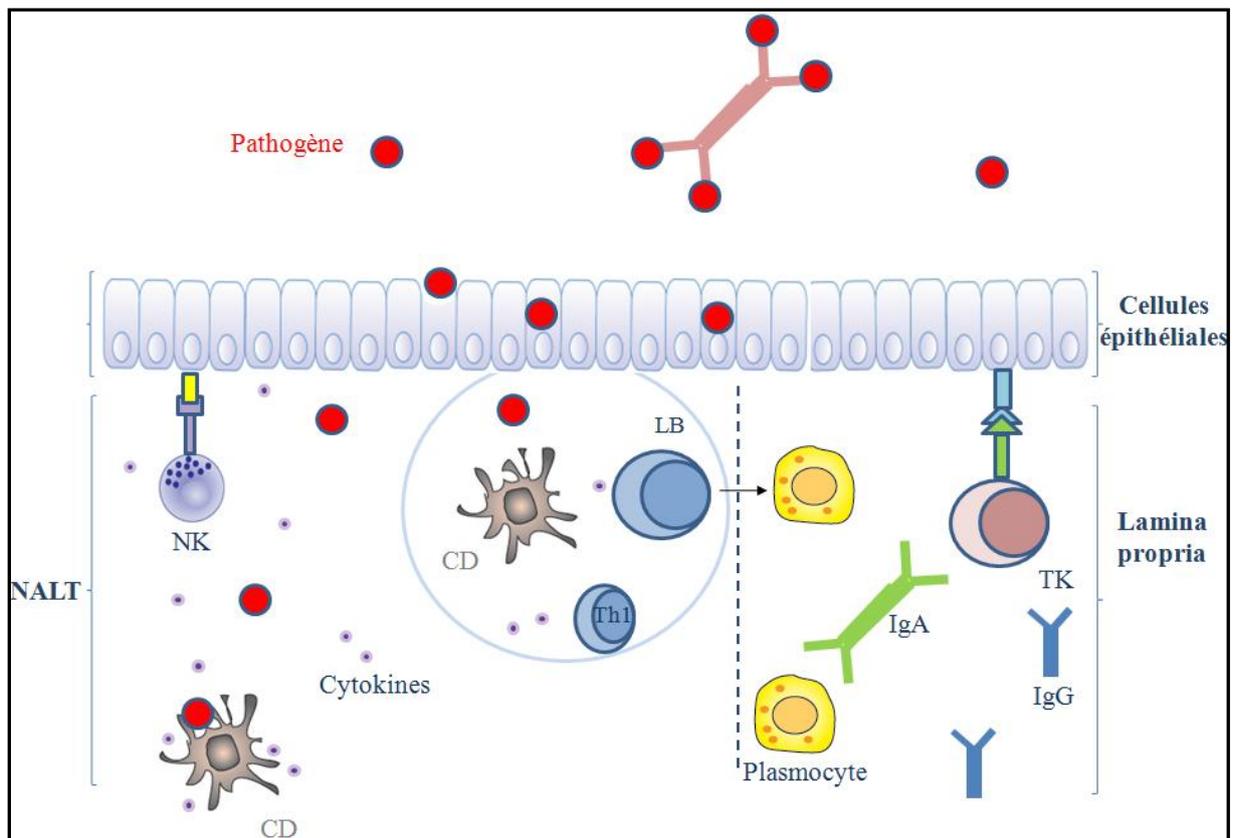


Figure 9 : Représentation schématique du NALT

Dans le cas particulier du virus de la grippe, l'induction de réponse immunitaire commence par la reconnaissance des composés viraux par le système immunitaire. Le génome du virus de la grippe qui est présenté par l'ARN simple brin (segmenté) est reconnu par différents TLR : TLR3, TLR7, TLR8 et par RIG-1. L'interaction de ces récepteurs avec leurs ligands initie des cascades de transduction de signaux intracellulaires, menant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et de nombreux « Interferon Regulatory Factors » (IRF) ; le résultat final étant l'induction de la réponse immunitaire innée. Il en résulte l'activation de nombreux types cellulaires tels que les CD, les macrophages et les fibroblastes qui sont capables d'exprimer des IFN de type I. Leur activité antivirale est médiée par la protéine kinase A qui bloque la synthèse des protéines et par la dégradation de l'ARN viral par la RNase1 (Tutykhina, Logunov et al. 2011).

Les cellules de l'immunité innée jouent un rôle important dans l'inhibition de l'infection par le virus de la grippe. En effet, les infiltrats pulmonaires produits durant l'infection virale contiennent majoritairement des neutrophiles, des cellules NK et des macrophages. Les neutrophiles qui apparaissent environ 18 heures après l'infection virale sont

capables d'adhérer aux cellules infectées par le virus et de phagocyter les virions. Ils stimulent aussi l'activité antivirale des autres types cellulaires, en sécrétant des médiateurs tels que la myéloperoxydase, les défensines et des dérivés actifs oxygénés, qui vont induire la production d'IFN- α ou de TNF- α . Les macrophages peuvent internaliser des particules virales, des cellules infectées par le virus et sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6 ou IFN- α/β et des chimiokines comme MCP-1 qui inhibent la réplication virale et stimulent la migration de cellules immunitaires vers les sites infectés. Les cellules NK apparaissent dans l'infiltrat pulmonaire 48 heures après l'infection virale ; lorsqu'elles reconnaissent les cellules infectées par le virus, elles exercent leurs fonctions cytotoxiques par la sécrétion de granzymes et de perforines et par la production d'IFN- γ qui empêche la réplication virale (Tutykhina, Logunov et al. 2011).

III. LES BACTERIES PROBIOTIQUES ALIMENTAIRES

Cette section est consacrée à la présentation des probiotiques, à leur sélection, ainsi qu'à la législation qui régit leur commercialisation. Nous détaillerons aussi leurs interactions avec l'hôte ainsi que leurs différents modes d'action.

1. Définition

Depuis les travaux de Metchnikoff sur les BL et leurs effets sur la longévité des Bulgares, l'idée de consommer des BL ayant un « effet santé » sur la santé du consommateur a été reprise par les scientifiques et par les industriels pour mieux faire connaître ces « bactéries santé » (Kingsley C. Anukam 2007; Vasiljevic 2007). Le terme « probiotiques » fut introduit dans la littérature en 1965 (pro: qui est positif et bios: vie, en opposition à antibiotiques) (Lilly DM 1965). En effet, si les antibiotiques ont pour vocation de tuer les bactéries ou d'empêcher leur propagation, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les probiotiques comme des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé au-delà des effets nutritionnels traditionnels (OMS, 2001). La majorité des bactéries probiotiques aujourd'hui sur le marché international, sont majoritairement des bactéries lactiques (BL) et plus particulièrement des bifidobactéries ou des lactobacilles (Forsythe and Bienenstock 2010; Bron, van Baarlen et al. 2011). Mais d'autres souches bactériennes sont commercialisées comme mentionné dans le tableau suivant.

Tableau 3: Exemple de souches probiotiques disponibles sur le marché international.

	Dénomination	Exploitant
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	Nestlé, Suisse
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio Dairy, Finlande
	<i>Lactobacillus casei</i> DN 114-001	Danone, France
	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Probi, Suède
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Rhodia, USA
	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult, Japon
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Yakult, Japon
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	Danone, France

	DN 173-010	
	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	Chr Hansen, USA
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Herdecke, Allemagne
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Biocodex, France

Les BL sont des bactéries à Gram positif qui produisent de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme. Elles regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium* (Dunne, O'Mahony et al. 2001). Les BL sont largement utilisées dans des procédés industriels de fermentation agro-alimentaire et certains genres comme les lactobacilles ou les bifidobactéries sont des bactéries commensales qui font partie du microbiote intestinal. Lorsqu'elles sont ingérées vivantes en grandes quantités, elles peuvent survivre dans le TD de l'hôte, où elles sont susceptibles d'exercer diverses actions bénéfiques. Du fait de leur parfaite innocuité et de leurs effets probiotiques (pour certaines), les BL sont de plus en plus étudiées pour le développement de nouveaux produits probiotiques apportant un effet bénéfique sur la santé et plus particulièrement sur l'équilibre du microbiote et sur la réponse immunitaire de l'hôte (Gorbach 2002; Borchers, Selmi et al. 2009). Les aliments fonctionnels et les compléments alimentaires dans lesquels sont incorporées des BL probiotiques connaissent depuis une dizaine d'années un très gros essor commercial.

Comme le montre le Tableau 3, il n'existe pas que des produits probiotiques à base de bactéries. En effet, *Saccharomyces boulardii* est une levure non pathogène qui a beaucoup été étudiée pour ses effets probiotiques. Elle est naturellement résistante à l'acidité gastrique, n'adhère pas aux cellules épithéliales et ne colonise pas l'intestin. Son activité clinique est essentiellement dirigée contre les diarrhées associées à la prise d'antibiotiques et les infections intestinales causées par *Clostridium difficile* (Czerucka, Piche et al. 2007; Wu, Vallance et al. 2008; McFarland 2010). D'autre part, la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 a montré des propriétés probiotiques dans différentes études. Cette souche aux propriétés anti-inflammatoires a montré des effets protecteurs dans le cadre d'inflammations intestinales sévères ou chroniques chez la souris (Schultz, Strauch et al. 2004; Goel, Mittal et al. 2009). Lors d'études cliniques, l'administration orale de cette souche a montré des réponses positives équivalentes au traitement classique (avec la méسالazine) en évitant les rechutes dans le cadre

des RCH et en traitant favorablement les gastroentérites (Kruis, Fric et al. 2004; Kruis, Chrubasik et al. 2011).

Le criblage d'un grand nombre de bactéries pour identifier des souches probiotiques est de plus en plus effectué (Cukrowska, Motyl et al. 2009; Guo, Kim et al. 2010; Koll, Mandar et al. 2010) du fait de la demande accrue en nouvelles souches probiotiques pour le développement de nouveaux produits probiotiques par les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques. Actuellement, les probiotiques sont utilisés dans le monde entier pour:

- L'intolérance au lactose (Masood, Qadir et al. 2011; Khani, Hosseini et al. 2012). En 2010, un panel de « European Food Safety Authority » (EFSA) a reconnu que les BL présentes dans le yaourt améliorent la digestion du lactose. Cet effet physiologique a été reconnu bénéfique pour les personnes ayant une mauvaise digestion du lactose (EFSA Panel on Dietetic Products 2010),
- Le traitement des diarrhées (Sazawal, Hiremath et al. 2006),
- La réduction des allergies (Rigaux, Daniel et al. 2009; van der Aa, van Aalderen et al. 2010),
- La prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et pour éviter les rechutes dans des pathologies telles que la rectocolite hémorragique (RCH) (Hedin, Whelan et al. 2007; Hegazy and El-Bedewy 2010; Pagnini, Saeed et al. 2010),
- Le traitement des infections respiratoires (Guillemard, Tondu et al. 2010),
- Le maintien de la santé bucco-dentaire (Pham, Hoogenkamp et al. 2010),
- La prévention de certains cancers (Rafter, Bennett et al. 2007; Ma, Choi et al. 2010).

De par leurs vastes domaines d'application, les critères de sélection d'une bactérie probiotique sont nombreux et seront présentés dans la section suivante.

2. Comment sélectionner une souche probiotique ?

Diverses espèces bactériennes sont utilisées depuis des décennies dans la production d'aliments, soit directement dans leur fabrication, soit comme une source d'additifs ou d'enzymes alimentaires. Mais la sélection d'une bactérie à ajouter dans un produit probiotique doit tenir compte de nombreux critères que nous allons décrire dans les prochains paragraphes.

2.1. Quelle bactérie sélectionner ?

Si les BL possèdent généralement le statut « Generally Recognized As Safe » (GRAS) ; pour les souches bactériennes n'appartenant pas à ce groupe, il est important de vérifier ce statut, puisque le produit probiotique doit présenter une parfaite innocuité pour le consommateur et l'environnement. En conséquence, un outil permettant d'identifier rapidement les risques relatifs à l'utilisation de telle ou telle bactérie dans la production de denrées alimentaires a été créé. En effet, l'EFSA a adopté depuis 2007 l'approche « Qualified Presumption of Safety » (QPS) pour l'évaluation des risques potentiels à l'utilisation des bactéries dans le domaine alimentaire (EFSA 2007). Cette approche tient compte de i) la définition de la taxonomie de la bactérie, ii) la collection d'informations suffisantes pour évaluer le statut QPS (données écologiques, utilisations industrielles antérieures, résultats d'études cliniques...), iii) l'exclusion des caractères de pathogénicité de la souche concernée et iiiii) la définition de l'utilisation finale de la souche. Un arbre de décision (Figure 10) a été publié par Sanders et al. en 2010 à cette fin (Sanders, Akkermans et al. 2010).

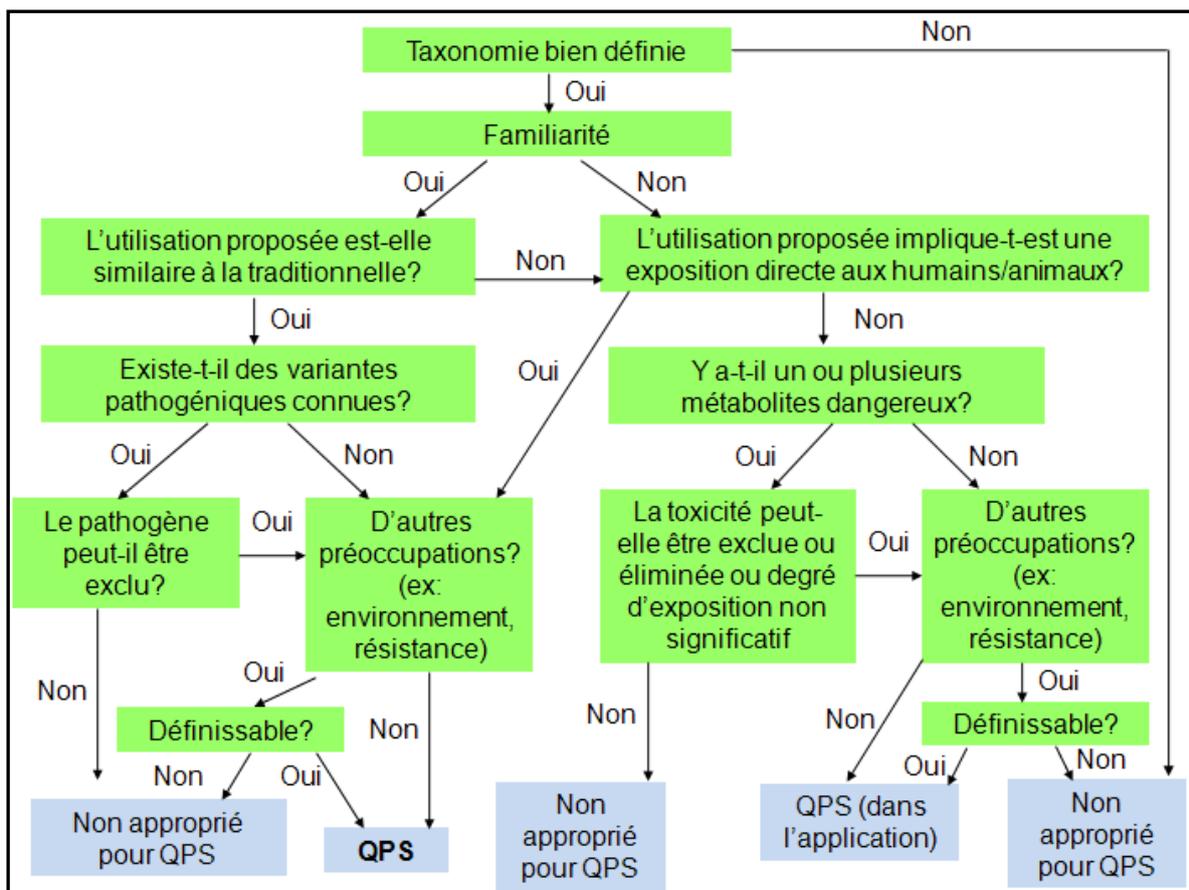


Figure 10: Arbre de décision pour évaluer le statut QPS d'une souche bactérienne

S'il n'y a pas de problème de sécurité pour un groupe taxonomique donné, ou si ces présomptions ou soucis de sécurité ont été dissipés, alors le statut QPS peut être accordé. Par la suite, une souche bactérienne catégoriquement attribuée à un groupe QPS pourrait être exemptée d'une évaluation de sécurité supplémentaire. Les bactéries qui ne répondent pas aux critères QPS peuvent être soumises à une évaluation de sécurité complète. Les BL, qui comprennent certaines espèces de bactéries probiotiques, ont été parmi les premiers groupes à être évalués. L'introduction de ce système semble être favorablement reçue à ce jour.

Le statut QPS est considéré par certains comme moins flexible que le système GRAS utilisé aux États-Unis, en tenant compte de nouveaux risques émergents pour la sécurité tels que l'acquisition de résistance aux antibiotiques et les déterminants de la virulence (Sanders, Akkermans et al. 2010). En utilisant cette méthode, l'EFSA a ainsi communiqué une liste de bactéries reconnues comme QPS. Ces bactéries sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Liste des bactéries reconnues pour leur statut QPS.

Bactéries Gram+ non sporulantes	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lactobacillus panis</i>	<i>Lactobacillus kefirifaciens</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus kefirii</i>
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus pontis</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	

<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Pediococcus dextrinicus</i>	
<i>Propionibacterium. freudenreichii</i>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
Bacillus	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Bacillus lentus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	

De plus, les BL recombinantes ou génétiquement modifiés peuvent être utilisées comme probiotiques recombinants. Ces bactéries permettent par exemple de délivrer des protéines d'intérêt santé dans l'environnement intestinal. Ces protéines peuvent être des enzymes (Matsumoto, Hara et al. 2005), des interleukines (Schotte, Steidler et al. 2000), ou encore des agents anti-oxydants (Han and Fioramonti 2008).

Actuellement, ces bactéries recombinantes sont interdites sur le marché européen. L'identification de nouveaux probiotiques est donc focalisée uniquement sur l'étude de bactéries naturellement présentes dans l'environnement.

2.2. Tests *in vitro* à effectuer sur la souche

Un produit probiotique doit être capable de survivre dans le produit final (matrice humide ou sèche) ainsi que dans le TD de sorte à délivrer son effet bénéfique dans l'intestin grêle et dans le côlon. Pour faciliter sa production en vue d'une commercialisation dans un produit final, la souche devrait présenter une bonne activité et viabilité ainsi qu'une bonne résistance à la congélation et à la lyophilisation. Il est aussi important de considérer les aspects fonctionnels de la souche tels que ses activités anti-microbiennes et métaboliques, ainsi que son pouvoir immuno-modulateur. Ces différents aspects sont résumés dans la Figure 11.

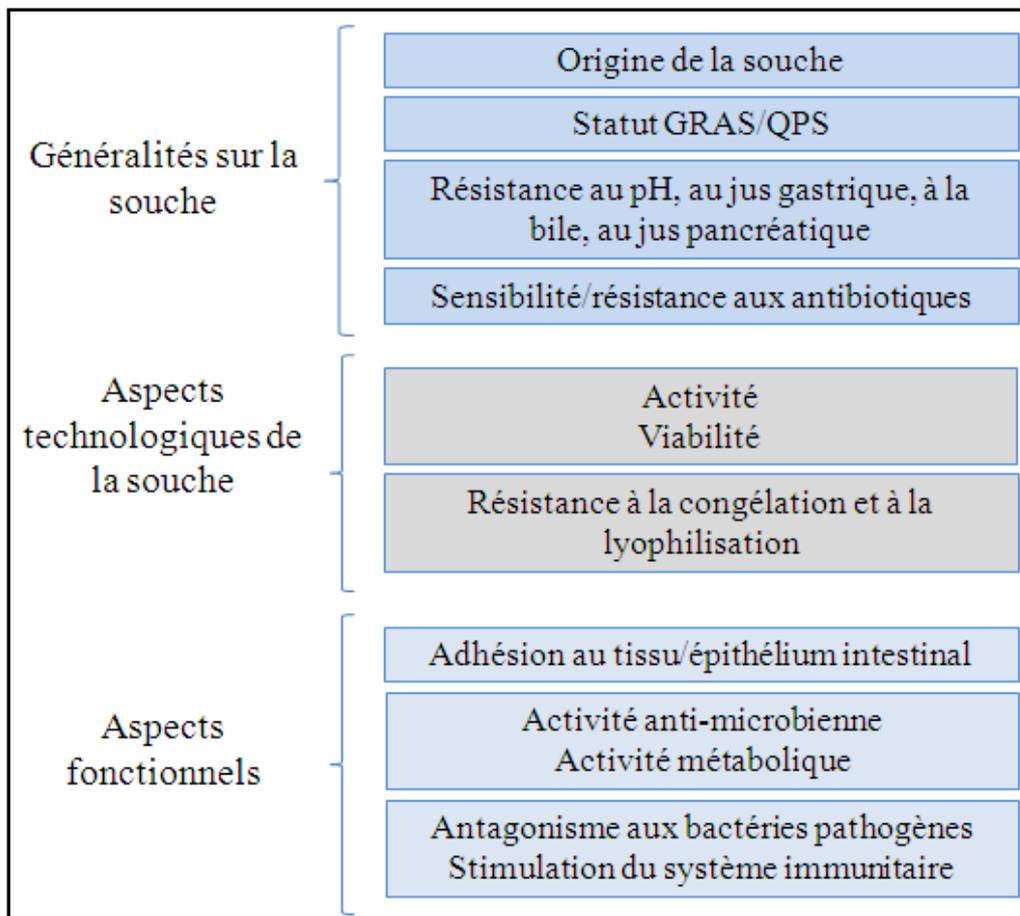


Figure 11: Récapitulatif des aspects généraux, technologiques et fonctionnels à étudier pour l'identification de nouvelles souches probiotiques

Les études *in vitro* sont d'autant plus importantes que chaque effet est souche-dépendant et qu'il n'est pas possible d'extrapoler les résultats d'une souche à une autre même si les deux souches appartiennent au même genre bactérien. De plus, ces études permettent de prévoir dans certains cas les effets des souches *in vivo*. Les études menées *in vivo* sont généralement réalisées chez les rongeurs (souris et rats). Ces études ont l'avantage entre autres d'étudier la survie des bactéries ainsi que leurs activités dans l'environnement dynamique du TD. Lorsque l'effet bénéfique des souches est observé chez l'animal, il est alors possible de passer à l'étude de la souche chez l'homme.

2.3. Tests technologiques et passage chez l'homme

Lors de la production des produits à bases de souches probiotiques, les industriels doivent tenir compte de trois paramètres différents mentionnés dans la Figure 12 : i) les paramètres relatifs au produit comme les conditions de croissance de la souche probiotique, ii) ceux liés à la production industrielle et qui sont de type technologique tels que les conditions

de fermentation et iii) ceux en rapport avec les conditions de survie de la souche dans le TD du consommateur (Klein, Sanders et al. 2010).

Des chercheurs ont proposé une liste des propriétés souhaitées des souches probiotiques pour pouvoir exercer des effets bénéfiques chez l'hôte. Ainsi, ces souches devraient i) avoir une bonne viabilité et résister aux pH acides et aux sels biliaires, ii) persister dans le TD sans pour autant le coloniser vu qu'elles seront apportées régulièrement par l'alimentation de l'hôte et iii) adhérer de façon transitoire à l'épithélium intestinal pour éviter d'être éliminées par le péristaltisme (Galdeano, de Moreno de LeBlanc et al. 2007).

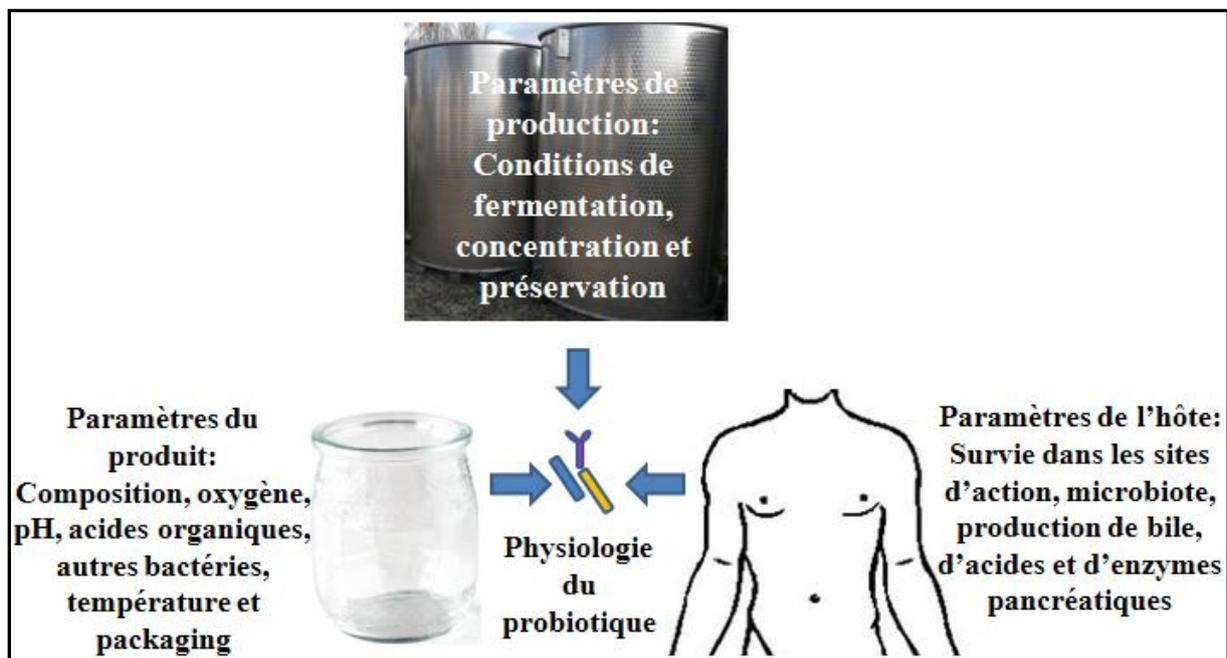


Figure 12: Paramètres à respecter lors de la production de produits probiotiques

Un défi important dans le domaine des probiotiques est de comprendre comment certains facteurs peuvent influencer la physiologie du probiotique. D'un autre point de vue, c'est la physiologie des probiotiques qui influence la fonctionnalité et la stabilité du produit lorsqu'il est consommé. Un autre critère dont il faut tenir compte est la dose de bactéries à ajouter dans le produit pour observer l'effet santé recherché. En effet, les doses nécessaires varient selon la souche et le produit. Les doses requises pour obtenir des effets bénéfiques sont couramment rapportées pour être de l'ordre de $1-10 \times 10^9$ Colonies Formant Unité (CFU)/jour. Cependant, les doses efficaces sont parfois moins importantes. Il suffit dans certains cas d'administrer seulement 1×10^8 CFU/jour pour observer un effet bénéfique des

produits probiotiques. Etablir un dosage général pour tous les probiotiques n'est pas possible, il faudrait plutôt s'appuyer sur des études menées chez l'homme et ayant déterminé la dose appropriée pour observer un bénéfice pour la santé. Ce paramètre doit aussi être compatible avec une prise quotidienne par le consommateur (Klein, Sanders et al. 2010).

3. Probiotiques et allégations

On appelle allégation tout message figurant sur les emballages alimentaires ou mentionné durant les campagnes de marketing, et qui fait état des propriétés sanitaires et/ou nutritionnelles des aliments ou de leurs composants. Le rôle de l'EFSA est de contrôler ces allégations en évaluant et en communiquant sur l'ensemble des risques liés à la chaîne alimentaire. Ses avis permettent d'étayer les stratégies et les décisions prises par les gestionnaires de risques. Une grande partie des travaux de l'EFSA est entreprise en réponse à des demandes spécifiques de conseils scientifiques. Les demandes d'évaluation scientifique sont émises par la Commission européenne, le Parlement européen et les États membres de l'Union Européenne.

D'un point de vue réglementaire différentes allégations sont distinguées : nutritionnelle quand elle fait référence à la teneur d'un nutriment dans un aliment (par exemple : la teneur ou les apports recommandés en vitamine C) et santé quand elle met en exergue un lien entre un nutriment ou un aliment et l'amélioration de l'état de santé du consommateur. Une allégation santé peut revendiquer la diminution d'un facteur de risque (par exemple : les oméga 3 réduisent les risques cardio-vasculaires) ou celle d'un risque de maladie, mais elle ne peut pas comporter de mention thérapeutique indiquant que tel nutriment peut prévenir une pathologie ou la guérir (par exemple : le calcium prévient l'ostéoporose).

Pour évaluer les effets bénéfiques d'un produit probiotique, il est indispensable de se poser les questions suivantes : est-ce que l'effet revendiqué est un effet physiologique positif ? Et quelles sont les études ou les mesures qui sont appropriées pour justifier l'allégation en question ?

Les effets des probiotiques étant multiples, on trouve ainsi différents produits probiotiques commercialisés mentionnant diverses allégations conduisant à un début d'anarchie. Pour cette raison, l'EFSA a estimé en 2007 que les industriels devaient fournir les preuves scientifiques qui décrivent les effets bénéfiques du produit probiotique avant sa commercialisation. L'effet bénéfique du produit doit donc avoir été testé avant sa mise sur le

marché chez l'homme dans des essais menés en double aveugle contre un placebo. De ce fait, plusieurs produits probiotiques commercialisés avant 2007 se sont vus obligés de retirer l'allégation mentionnée sur le produit pour manque de preuve scientifique relative à l'effet santé du produit probiotique.

4. Dialogue bactérie/hôte

La Figure 13 montre la répartition des bactéries le long du TD, les genres bactériens retrouvés, et le stress auxquels les bactéries doivent faire face. Elle montre un gradient ascendant en nombre de bactéries le long du TD. La plus grande diversité bactérienne est retrouvée au niveau du côlon, où co-habitent des bactéroïdes, des lactobacilles, des bifidobactéries, des entérobactéries et beaucoup d'autres bactéries. Au cours de leur passage dans le TD, les bactéries probiotiques font face à différents stress, tels que le péristaltisme, l'acidité, le mucus, les sucs pancréatiques, et les sels biliaires (Coudeyras and Forestier 2010).

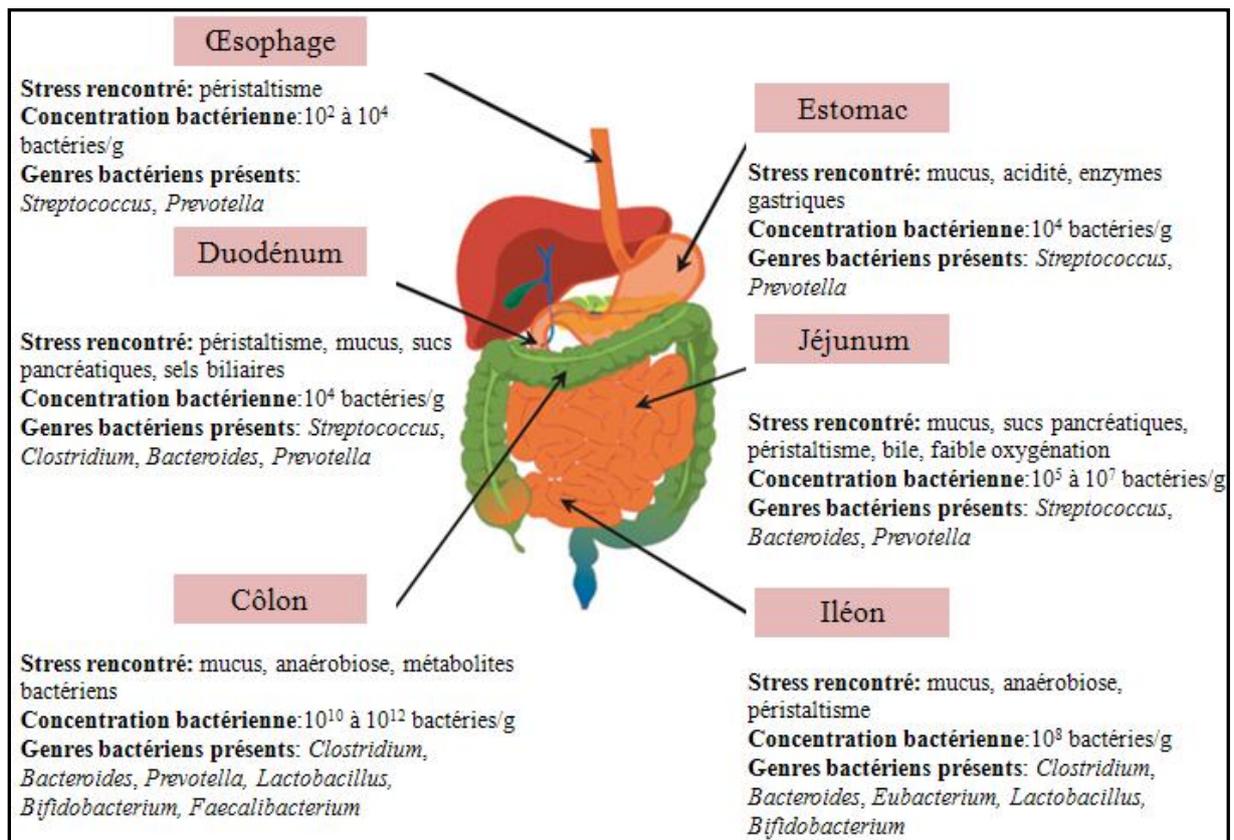


Figure 13: Répartition bactérienne dans le TD, genres bactériens retrouvés et stress rencontrés par les bactéries

Afin d'étudier l'effet des bactéries du microbiote sur l'hôte, des chercheurs ont utilisé des modèles *in vivo* dépourvus de bactéries : les souris axéniques (O'Hara and Shanahan 2006). Ils ont montré que ces souris étaient plus sensibles aux infections par rapport aux souris conventionnelles. Leurs activités enzymatiques ainsi que leur production de cytokines sont moins développées et elles montrent des hypoplasies (arrêt du développement ou un développement insuffisant) au niveau des PP (O'Hara and Shanahan 2006). Il en résulte des altérations au niveau de leur système immunitaire intestinal. Cependant, il est possible de restaurer le système immunitaire des souris axéniques en leur transférant le microbiote provenant de souris conventionnelle (O'Hara and Shanahan 2006; Round and Mazmanian 2009).

Le microbiote joue un rôle essentiel dans la maturation du système immunitaire de l'hôte et est par conséquent indispensable pour la santé de l'hôte. Un déséquilibre au niveau du microbiote est observé dans différentes pathologies telles que les diarrhées, la maladie de Crohn (MC), et la rectocolite hémorragique (RCH). La prise d'antibiotiques modifie aussi la composition du microbiote comme schématisé dans la Figure 14. Il en résulte une diminution de la diversité des espèces bactériennes, mais aussi des dysfonctionnements du système immunitaire. Le contrôle du microbiote semble donc être important pour maintenir l'homéostasie intestinale (Preidis and Versalovic 2009; Garrett, Gordon et al. 2010; Oelschlaeger 2010; Bron, van Baarlen et al. 2011).

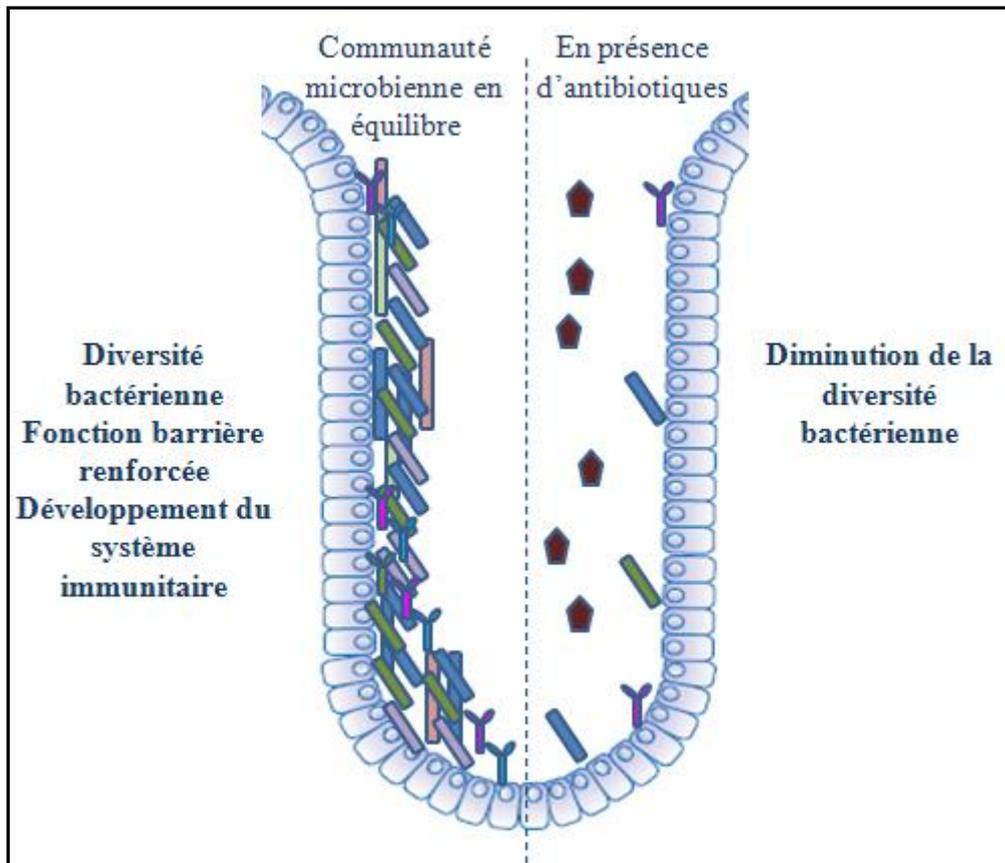


Figure 14: Schéma représentant le microbiote avant et après un traitement antibiotique

Ainsi, l'épithélium intestinal fournit la première ligne de défense de l'hôte en faisant la distinction entre les bactéries commensales et les microorganismes pathogènes. La Figure 15 montre l'interaction des bactéries avec les cellules de l'hôte. Les entérocytes de surface détectent les MAMP par leurs PRR et répondent en sécrétant des chimiokines et cytokines qui alertent et dirigent les réponses immunitaires innées et adaptatives vers le site infecté. Les cellules M transportent des particules bactériennes ou virales de la lumière intestinale vers les CPA. D'autre part, les CD peuvent interagir directement avec les contenus intestinaux grâce aux dendrites en s'intercalant entre les entérocytes sans perturber les jonctions serrées. Les CPA et les CD interagissent avec cellules T naïves pour induire soit une réaction immunitaire soit la tolérance vis-à-vis des MAMP (O'Hara and Shanahan 2006; Garrett, Gordon et al. 2010).

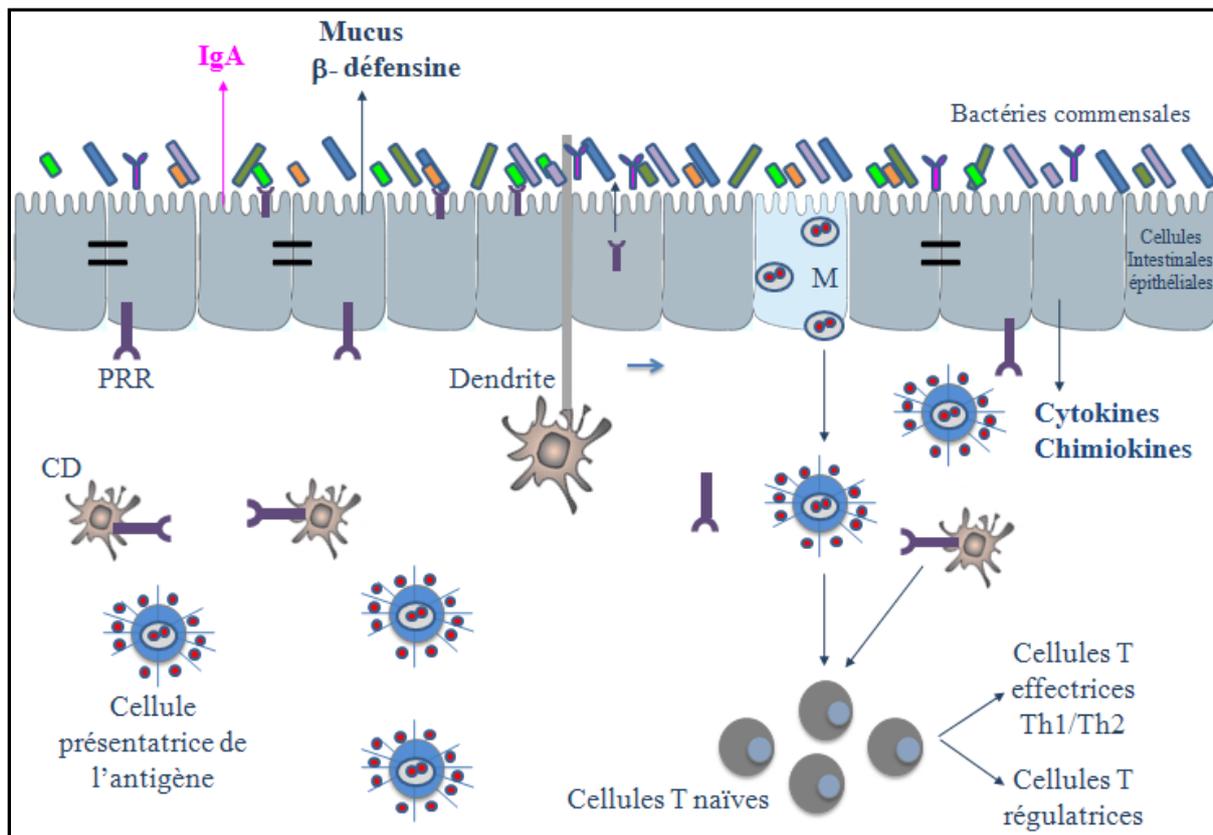


Figure 15: Schéma représentant l'interaction des bactéries avec les cellules de l'hôte

En réponse à des pathogènes, les bactéries commensales peuvent aussi limiter, voire inhiber la voie de signalisation NF- κ B. La Figure 16 montre un exemple d'activation de cette voie de signalisation, par des bactéries pathogènes comme *Salmonella typhimurium*. Ces bactéries activent des kinases dont le but est de phosphoryler l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B). I κ B sera dégradé au sein du protéasome dans le cytoplasme permettant ainsi à NF- κ B de transloquer dans le noyau et d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires. Les bactéries commensales agissent à deux niveaux : i) en évitant la dégradation de I κ B ou ii) en exportant la sous unité p65 de NF- κ B en dehors du noyau, ce qui empêche son action de facteur de transcription, et évite ainsi l'inflammation (Kelly, Campbell et al. 2004; Petrof, Kojima et al. 2004; O'Hara and Shanahan 2006).

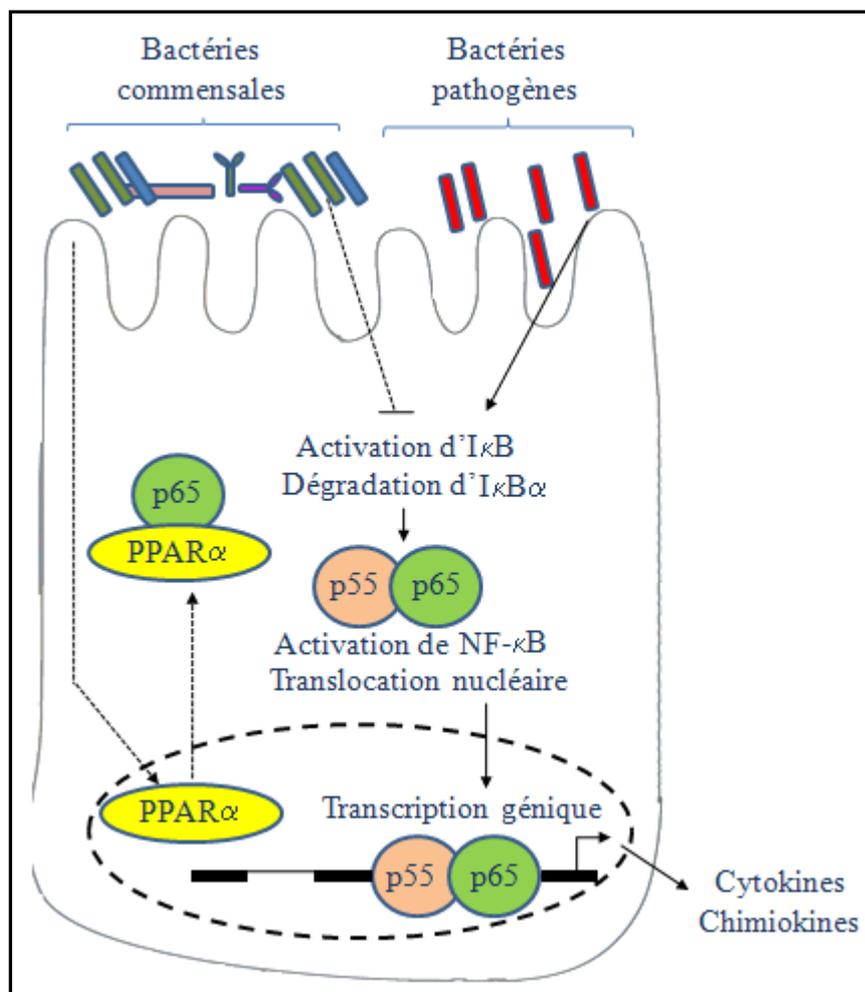


Figure 16: Inhibition de la voie de signalisation NF-κB par les bactéries commensales

Le dialogue bactérie/hôte peut également s'effectuer par l'intermédiaire de molécules produites par le microbiote. Par exemple, le butyrate produit par les bactéries commensales est capable de moduler la voie NF-κB (inhibition d'IκB). Il en résulte i) une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-8, IL-12 et TNF-α, et ii) un maintien de l'homéostasie (Magalhaes, Tattoli et al. 2007).

L'arrivée d'une bactérie probiotique au niveau de l'intestin va moduler l'immunité mucosale, en interagissant directement avec les cellules immunitaires et l'épithélium intestinal (Figure 17). Une bactérie au profil anti-inflammatoire va induire une réponse médiée par la production de TGF-β produite par les cellules épithéliales, ainsi que la production d'IL-10 par les macrophages et les CD. Au contraire, une bactérie pro-inflammatoire stimulera la production des cytokines IL-6 et IL-8 par les cellules épithéliales et la production d'autres

cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-12 et IL-1 par les macrophages et les CD (Preidis and Versalovic 2009).

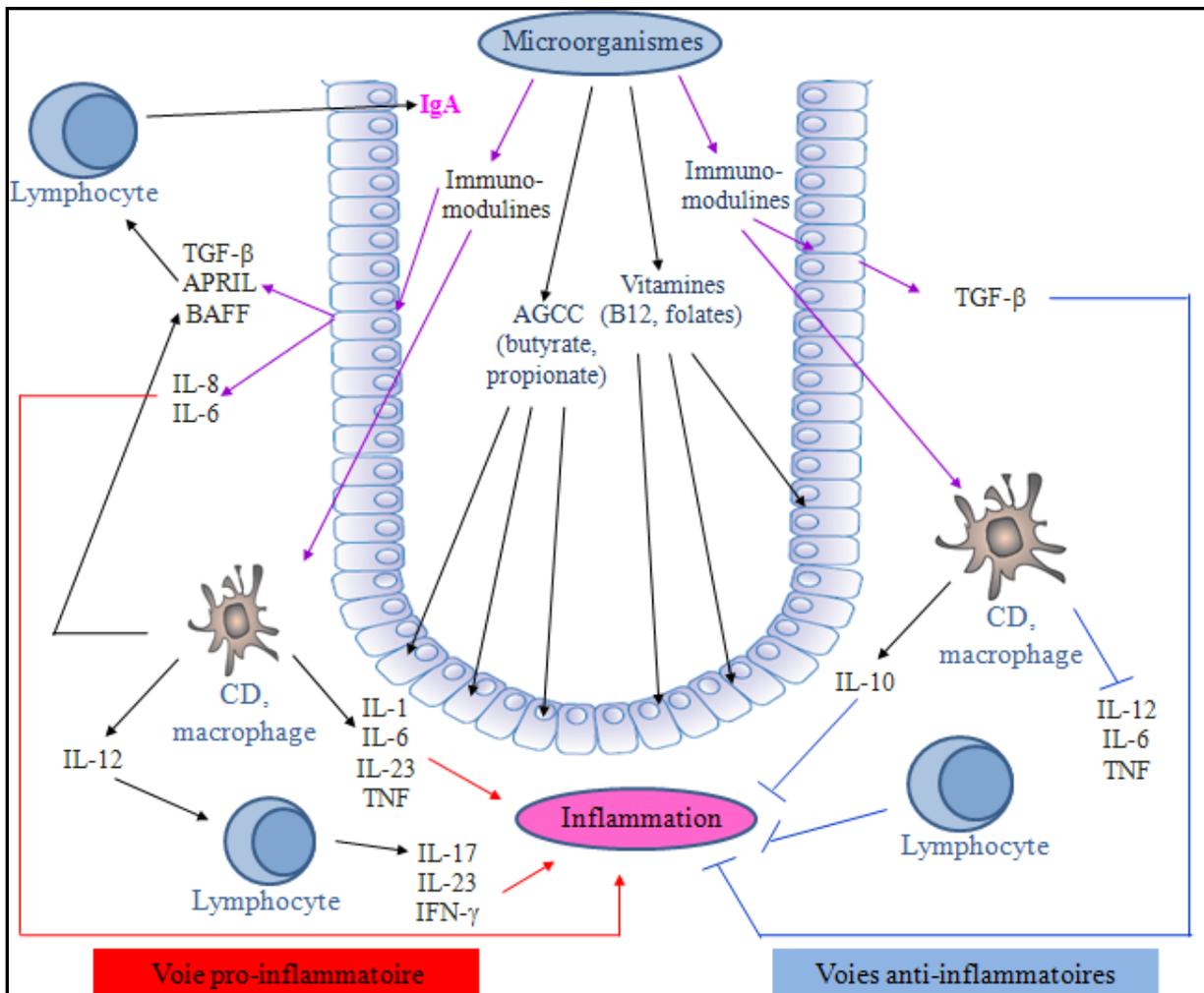


Figure 17: Schéma représentant la cascade de réactions induites par l'arrivée d'une bactérie au niveau de l'épithélium intestinal

5. Mécanisme d'action des bactéries probiotiques

Les mécanismes d'action des probiotiques impliqués dans les effets bénéfiques exercés sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et souche-dépendants. En effet, ces bactéries participent au maintien de l'homéostasie du microbiote. L'une de leurs particularités est de stabiliser ou remodeler le microbiote en réponse à un stress spécifique, en favorisant, par exemple, le retour à une communauté microbienne de base suite à un événement perturbateur comme un traitement par des antibiotiques (Preidis and Versalovic 2009).

L'effet des bactéries probiotiques est amplifié par l'apport de prébiotiques (fructo-oligosaccharides ou oligo-fructose) par l'alimentation. Un prébiotique étant un ingrédient alimentaire non digestible qui affecte l'hôte positivement en stimulant sélectivement la croissance ou l'activité d'une bactérie ou d'un nombre réduit de bactéries dans le côlon, et qui par conséquent améliore la santé de l'hôte. Elles favorisent aussi la production d'AGCC et de vitamines. Elles participent aussi au maintien de jonctions épithéliales serrées et de façon plus générale apportent plusieurs bienfaits à l'hôte comme montré dans la Figure 18 (Gibson and Roberfroid 1995).

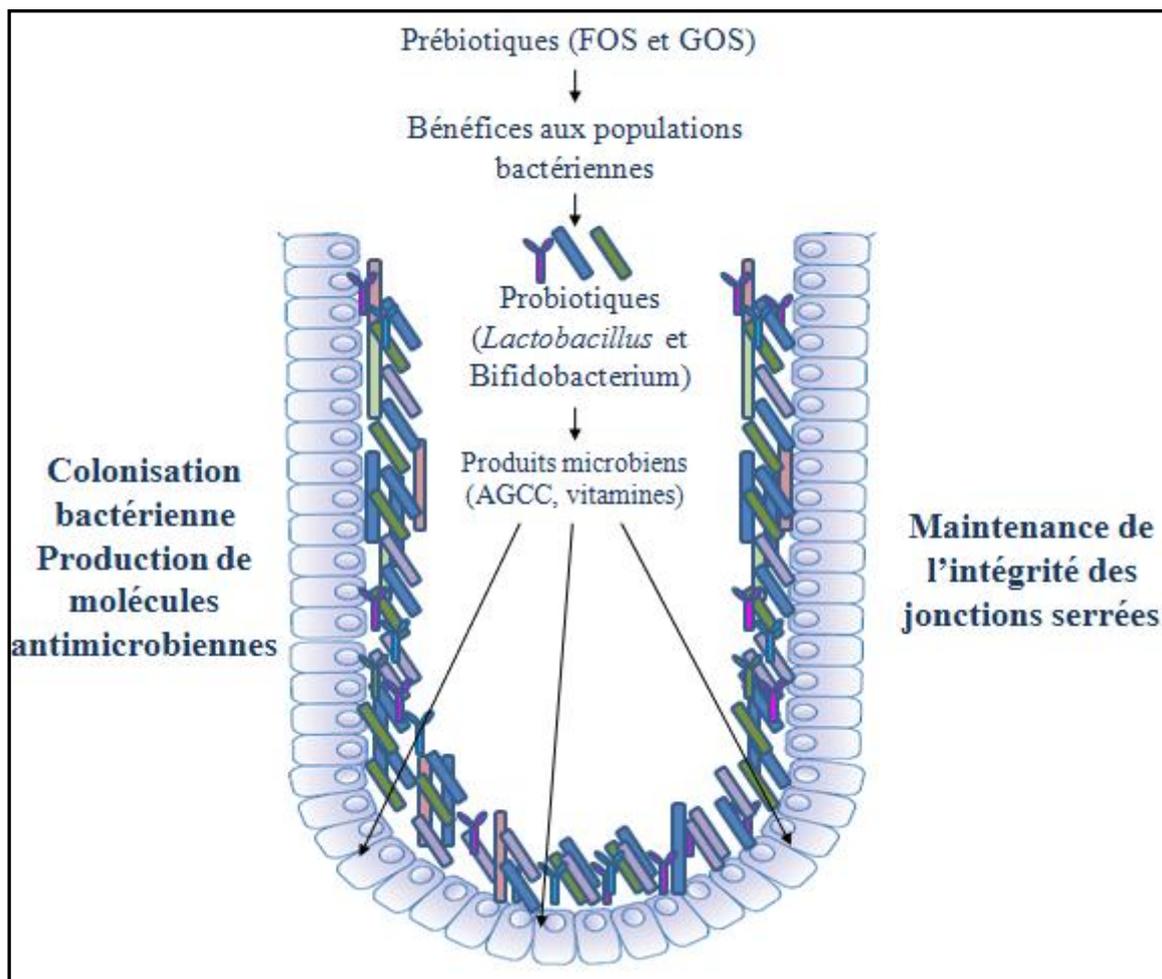


Figure 18: Schéma représentant les effets bénéfiques d'une bactérie probiotique au niveau de l'épithélium intestinal

Les effets des probiotiques sont attribués à une modulation directe ou indirecte du microbiote ou du système immunitaire local. Ceci implique un contact direct de ces

probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, et les cellules épithéliales.

En effet, les bactéries probiotiques peuvent user de différentes stratégies pour combattre des bactéries pathogènes ou les infections. Tout d'abord, ces bactéries peuvent bloquer l'entrée des pathogènes dans les cellules épithéliales en créant une barrière physiologique bactérienne (Figure 19a).

Elles ont aussi la capacité d'induire la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes pour créer une barrière de mucus qui empêche l'adhésion des bactéries pathogènes (Figure 19b).

D'autres part, ces bactéries participent au maintien de la perméabilité intestinale en augmentant l'intégrité intracellulaire des jonctions apicales serrées (Figure 19c) et permettent la production de composés antimicrobiens (bactériocines) pour lutter contre la présence de bactéries pathogènes (Figure 19d).

Elles peuvent aussi stimuler le système immunitaire en induisant la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 ou TGF- β) par la stimulation du système immunitaire inné et plus précisément les CD (Figure 19e) et favoriser le déclenchement par les bactéries ou leurs composés bactériens produits d'une réponse immunitaire innée en induisant la production de cytokines par les cellules épithéliales (Figure 19f).

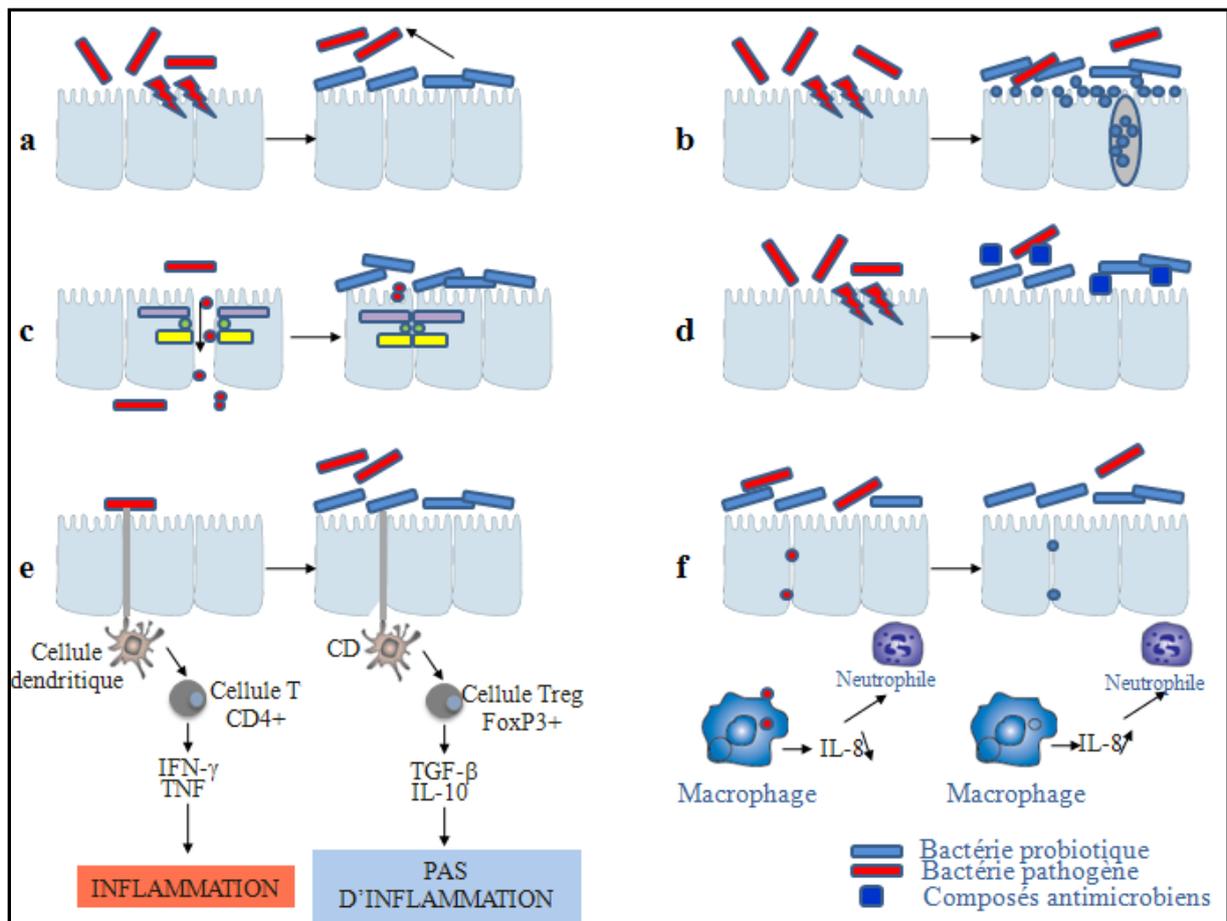


Figure 19: Mécanismes d'action possibles des bactéries probiotiques

Il est aussi possible de classer les effets des probiotiques en trois catégories selon leur mode d'action :

- Modulation des défenses de l'hôte par les réponses immunitaires innée et adaptative. Cette faculté est importante dans la prévention et le traitement des maladies infectieuses, mais aussi dans le traitement des inflammations du TD (Oelschlaeger 2010; Bron, van Baarlen et al. 2011).
- Action directe sur les autres microorganismes, aussi bien les bactéries commensales que les pathogènes. C'est une propriété importante pour les bactéries probiotiques dans la prévention et la thérapie des infections, mais aussi dans la restauration de l'équilibre du microbiote intestinal après une perturbation passagère (Oelschlaeger 2010; Bron, van Baarlen et al. 2011).
- Détoxification de l'hôte et l'inactivation des toxines (Oelschlaeger 2010; Bron, van Baarlen et al. 2011).

IV. UTILISATION DES PROBIOTIQUES EN SANTE HUMAINE

L'identification des effets des souches probiotiques commence par des tests *in vitro*. Les essais *in vivo* sont d'une importance capitale puisqu'ils permettent de i) confirmer les résultats obtenus *in vitro* et ii) constituer une preuve de l'effet bénéfique de la souche bactérienne testée pour un essai chez l'homme. Nous traiterons dans cette section trois types d'utilisations potentielles des probiotiques en santé humaine.

1. Identification de souches immuno-modulatrices *in vitro*

Divers modèles cellulaires ont été mis au point pour sélectionner des souches selon leurs propriétés immuno-modulatrices. Parmi les modèles cellulaires existants, les plus utilisés sont les cellules mononucléaires périphériques du sang (PBMC, « Peripheral Blood Mononuclear Cells) et les lignées HT-29 et Caco-2 issues d'adénocarcinome colique humain. Les différentes études menées sur des inflammations intestinales ont montré la nécessité de tester des souches bactériennes ayant des propriétés anti-inflammatoires. Il est donc important de mesurer le caractère anti-inflammatoire des souches qui seront testées par la suite chez l'animal et plus tard chez l'homme.

Les PBMC sont utilisées directement pour déterminer le profil immuno-modulateur des bactéries grâce à l'induction de cytokines telles qu'IL-10 ou l'IL-12 (Drouault-Holowacz, Foligne et al. 2006; Foligne, Nutten et al. 2007; Sokol, Pigneur et al. 2008; Foligne, Dewulf et al. 2010; Perez-Cano, Dong et al. 2010). Comme ces cellules sont d'origine humaine, il est préférable d'utiliser des cellules de différents individus pour comparer les propriétés immuno-modulatrices de souches bactériennes. Foligné *et al.* ont utilisé les PBMC pour déterminer les propriétés immuno-modulatrices de BL. Pour cela, ils ont co-incubé les cellules avec les bactéries pendant 6 heures et dosé ensuite les cytokines IL-10 et IL-12 (d'autres cytokines ont été dosées mais elles n'étaient pas aussi discriminantes que celles là). Ils ont par la suite calculé le rapport IL-10/IL-12 pour chaque bactérie, ce ratio permettant d'estimer un profil pro-inflammatoire (faible ratio) d'un profil anti-inflammatoire (fort ratio). Ces BL ont été ensuite testées *in vivo* dans un modèle d'inflammation intestinale. Seules les souches présentant un rapport IL-10/IL-12 élevé se sont révélées efficaces en atténuant les effets de la

colite. La corrélation entre les résultats *in vitro* et ceux obtenus chez la souris témoigne du caractère prédictif des essais *in vitro* (Foligne, Nutten et al. 2007).

Les lignées cellulaires HT-29 et Caco-2 se maintiennent facilement en culture grâce à des repiquages successifs. Elles nécessitent, en revanche, une induction par des molécules pro-inflammatoires (TNF- α pour HT-29 et IL-1 β pour Caco-2) pour produire la cytokine IL-8. Après co-incubation avec les bactéries, les dosages de cette cytokine permettent d'évaluer leurs profils immuno-modulateurs (O'Hara, O'Regan et al. 2006; Delcenserie, Martel et al. 2008; Chang, Shim et al. 2009; Sanz and De Palma 2009; West, Pyne et al. 2009; Grimoud, Durand et al. 2010). Une souche pro-inflammatoire va augmenter la production d'IL-8 alors qu'une souche anti-inflammatoire va diminuer, voire bloquer, sa production. Sokol *et al.* ont utilisé la lignée Caco-2 pour vérifier si la souche qu'ils étudiaient (*Faecalibacterium prausnitzii*) avait ou non des propriétés anti-inflammatoires. Ils ont montré que le surnageant bactérien diminuait la production d'IL-8 par les cellules Caco-2 après leur stimulation par IL-1 β (Sokol, Pigneur et al. 2008).

D'autres lignées cellulaires ont été utilisées, comme par exemple la lignée HT-29 transfectée par un gène rapporteur (luciférase) dont l'expression est sous le contrôle d'éléments de réponse à NF- κ B (facteur de transcription impliqué dans l'inflammation intestinale). Plus ce facteur est activé, plus il y aura production de luciférase. L'intensité du signal est proportionnelle à la production de la luciférase et à la stimulation de la cascade NF- κ B. Après induction de la lignée cellulaire par le TNF- α , les souches anti-inflammatoires vont inhiber le facteur NF- κ B et ainsi diminuer l'activité du gène rapporteur. Santos Rocha *et al.* ont utilisé ce système pour tester les propriétés anti-inflammatoire d'une cinquantaine de BL et de bactéries commensales (Santos Rocha, Lakhdari et al. 2011). Les souches les plus anti-inflammatoires identifiées *in vitro* ont ensuite été testées dans le cadre d'une inflammation intestinale chez la souris. Une des souches anti-inflammatoires a permis d'atténuer les effets d'une inflammation causée par le « Dextran Sodium Sulfate » (DSS) chez la souris (ce modèle sera détaillé plus loin). Une autre lignée a été testée : la lignée Caco-2 transfectée par un gène rapporteur (« Secreted Alkaline-Phosphatase », SEAP) dont l'expression est sous le contrôle d'éléments de réponse de NF- κ B. Après induction de la lignée cellulaire avec IL-1 β , Sokol *et al.* ont testé le surnageant bactérien de *F. prausnitzii*, et ont observé une diminution de l'activité de NF- κ B, confirmant ainsi les effets anti-inflammatoires de cette souche *in vitro*. Un essai *in vivo* dans un modèle de colite induite au « 2,4,6-TriNitroBenzene Sulfonic

acid » (TNBS) avec ce surnageant a confirmé les propriétés anti-inflammatoires observées *in vitro* (Sokol, Pigneur et al. 2008).

Il est aussi possible d'utiliser des macrophages murins pour tester les propriétés immuno-modulatrices de souches bactériennes. Après le sacrifice des souris, les cellules péritonéales sont isolées et mises en culture sur plaques (1×10^5 cellules/puits) dans un milieu riche pendant 2 heures à 37°C et sous atmosphère contrôlée. Les cellules sont ensuite lavées et les cellules adhérentes, considérées comme macrophages, sont utilisées pour la co-incubation macrophages/bactéries pendant 15 heures, à 37°C et sous atmosphère contrôlée. De même, la rate peut aussi être isolée après sacrifice des souris. Les cellules de la rate sont alors déposées sur plaques (5×10^5 cellules/puits) et co-incubées avec les bactéries à tester pendant 96 heures dans les mêmes conditions de culture citées ci-dessus. Les surnageants de culture sont ensuite utilisés pour déterminer la production de cytokines par ELISA. Ces deux techniques ont été utilisées par Murosaki *et al.* pour identifier le profil immuno-modulateur de la souche *L. plantarum* L-137 tuée par la chaleur. Ils ont montré que la souche testée avait un profil pro-inflammatoire. A une dose de 0,1 µg/ml, elle induit fortement la production de la cytokine IL-12 par les macrophages péritonéaux. Cette production d'IL-12 a été confirmée après co-incubation de la bactérie à une dose de 1 µg/ml avec les cellules de la rate. Cette souche induisait aussi la production d'IFN-γ par les cellules de la rate (Murosaki, Yamamoto et al. 1998).

Dans une autre étude, des macrophages péritonéaux, des CD, des cellules de la rate, des cellules du MLN et des cellules du PP murins ont été utilisées pour cribler 203 bactéries BL à la recherche de bactéries induisant fortement la production d'IL-12. Une souche en particulier, *L. plantarum* YU (LpYU), s'est démarquée des autres bactéries par une production accrue d'IL-12 par toutes les cellules citées (Kawashima, Hayashi et al. 2011).

2. Probiotiques et infections hivernales

Les infections hivernales étant considérées comme un problème de santé publique, il nous a paru intéressant d'étudier les effets des BL dans le cadre de ces infections. Après une description des infections hivernales, nous nous intéresserons aux études réalisées chez les rongeurs puis chez les humains visant à identifier des souches de BL aux effets bénéfiques sur leur santé.

2.1. Infections hivernales

Les infections hivernales sont très variées. Parmi elles, on peut citer la grippe et le rhume qui touchent le tractus respiratoire supérieur. Elles se multiplient en particulier en hiver à cause de la baisse de température qui déstabilise l'organisme. De plus, le froid assèche les muqueuses des voies respiratoires qui deviennent alors plus sensibles aux attaques bactériennes et virales. Nous nous intéresserons dans la suite seulement au virus de la grippe.

Les virus grippaux sont un réel problème de santé publique. Ils sont responsables de nombreuses infections du tractus respiratoire supérieur. D'autre part, ils causent entre 3 et 5 millions de cas graves par an et plus de 250 000 morts chaque année dans le monde selon l'OMS. Les symptômes de ces infections regroupent la fièvre, l'écoulement nasal, l'éternuement, les maux de têtes, mais aussi la toux et les maux de gorge. A l'approche de l'hiver, les meilleurs moyens de prévenir ces infections sans gravité mais gênantes et contagieuses sont recherchés. La plupart des sujets atteints guérissent en une à deux semaines sans traitement médical. La grippe fait courir des risques sérieux aux plus jeunes, aux personnes âgées et aux malades souffrant de certaines pathologies : pneumopathies, syndrome d'immuno-déficience acquise (SIDA), diabète, cancer, et problèmes cardiaques ou rénaux. Elle peut provoquer chez eux de graves complications, des pathologies concomitantes, la pneumonie et même la mort (Tutykhina, Logunov et al. 2011).

Les virus de la grippe sont des virus à ARN, appartenant à la famille des Orthomyxoviridae et au genre Influenzavirus, dont il existe trois types A, B et C distingués par l'antigénicité de leurs nucléoprotéines et par les hôtes qu'ils infectent. Les virus A et C infectent plusieurs espèces, tandis que le virus B est presque spécifique de l'espèce humaine. Les virus de type A sont classés en sous-types basés sur les propriétés anti-géniques de deux protéines virales de surface hemagglutinine (HA) and neuraminidase (NA). Les virus de type A : H1N1, H2N2 and H3N2 ont été à l'origine de pandémies grippales. En particulier, H1N1 et H3N2 causent régulièrement des épidémies saisonnières (Muller, Kakkola et al. 2011).

Les virus de la grippe influenza A sont reconnus chez l'hôte par les TLR3 et le RIG-I dans les CD myéloïdes et les cellules épithéliales alvéolaires et par le TLR7 dans les CD plasmacytoïdes. C'est la protéine non structurale 1 (NS1, formée dans les cellules infectées) qui a été reconnue comme facteur de virulence du virus. Elle a été décrite comme inhibitrice de l'immunité et permet alors au virus de la grippe d'échapper à la surveillance du système immunitaire de l'hôte et établir l'infection. Pour l'élimination complète du virus, l'immunité

adaptative est indispensable. En effet, les LT cytotoxiques et les Ac sont des effecteurs spécifiques d'un Ag. Ils ciblent le virus et achèvent son élimination (Maeda, Nakamura et al. 2009).

Grâce aux avancées scientifiques, il est heureusement possible de se protéger contre ces virus ou d'atténuer leurs symptômes. Le vaccin contre la grippe reste une bonne protection contre ce virus, mais il n'est malheureusement pas toujours bien supporté et n'est pas efficace à 100% en raison des changements des souches virales dominantes d'une année à une autre (Boge, Remigy et al. 2009; Nagai, Makino et al. 2011). Il est aussi possible d'utiliser des traitements homéopathiques, ou encore des cures de vitamines en prévention. Les probiotiques et les BL ont montré leur efficacité dans la prévention de ce genre d'infections (de Vrese, Winkler et al. 2006; Olivares, Diaz-Roperero et al. 2007; Boge, Remigy et al. 2009).

2.2. Modèles d'étude chez l'animal

Différentes études chez les rongeurs ont montré que l'administration orale de souches de lactobacilles favorise la résistance contre les infections avec les virus de la grippe. Des chercheurs ont montré que l'administration orale de la souche *L. casei* Shirota dès la naissance des souris permettait de diminuer leur infection par le virus de la grippe A/PR/8/34 en augmentant les taux de survie et en diminuant les charges virales dans les lavages nasaux (Yasui, Kiyoshima et al. 2004). Ces observations ont été confirmées chez des souris âgées de 15 mois dans une autre étude (Hori, Kiyoshima et al. 2002).

D'autres études sur l'effet protecteur de souches de BL dirigées contre les virus de la grippe selon différents protocoles possibles sont résumées dans le tableau 5. Les bactéries (au profil pro-inflammatoire *in vitro* ou non mentionné) sont administrées aux souris par voie orale ou par voie intra-nasale. Elles peuvent être administrées vivantes ou lyophilisées, avant et/ou après l'infection virale. Les résultats montrent généralement une prolongation du temps de survie des souris, ainsi qu'une diminution de leurs pertes de poids. L'étude approfondie des effets protecteurs concerne la production de cytokines (Maeda, Nakamura et al. 2009), la quantification de la charge virale dans les poumons des souris (Kawashima, Hayashi et al. 2011), et l'activité de cellules immunitaires (Harata, He et al. 2011).

Tableau 5 : Différentes conditions d'études de souches bactériennes dans des modèles d'infection virale chez la souris.

Références	(Maeda, Nakamura et al. 2009)	(Kawashima, Hayashi et al. 2011)	(Takeda, Takeshita et al. 2011)	(Harata, He et al. 2011)
Bactérie testée	<i>L. plantarum</i> L-137 (HK-LP)	<i>L. plantarum</i> LpYU	<i>L. plantarum</i> 06CC2	<i>L. rhamnosus</i> LGG
Profil immuno-modulateur <i>in vitro</i> de la bactérie	pro-inflammatoire (↑IL-12 et TNF-α)	pro-inflammatoire	Non mentionné	Non mentionné
Administration de la bactérie	Gavages quotidiens	Gavages quotidiens	2 gavages quotidiens	Voie intra-nasale
Etat physiologique et dose de la bactérie administrée	bactérie lyophilisée (75 mg/kg/jour)	Bactérie vivante (0,011 ; 0,21 et 2,1 mg/jour)	Bactérie lyophilisée (20 mg/jour)	Bactérie lyophilisée (10 mg/ml/jour)
Durée d'administration par rapport au jour de l'inoculation du virus	7 jours avant et 7 jours après	7 jours avant et 7 jours après	2 jours avant et 7 jours après	3 jours avant
Virus inoculé	Influenza H1N1 A/FM1/47	Influenza H1N1 A/NWS/33 ; 2x10 ⁴ PFU/souris	Influenza H1N1 A/PR8/34	Influenza H1N1 A/PR8/34
Résultats obtenus suite à l'administration de la bactérie	- ↑ temps de survie des souris - ↓ de la charge virale - Production d'IFN-β	- ↓ de la perte de poids - ↓ de la prolifération du virus dans les poumons et les lavages broncho-alvéolaires	- ↓ significative de la perte de poids - ↑ significative de la survie des souris	- ↑ de l'activité cellulaire des cellules NK

D'autres études sur des BL comme *L. fermentum* CECT5716 ou *B. breve* YIT4064 ont montré que leur administration orale induisait des effets protecteurs contre des infections virales. Les mécanismes d'action des bactéries ayant des effets anti-viraux et plus particulièrement contre le virus de la grippe ne sont pas encore élucidés mais quelques hypothèses ont été avancées (Yasui, Nagaoka et al. 1994; Olivares, Diaz-Roperero et al. 2007). Du côté de l'hôte, l'immunité innée est déclenchée et constitue la première ligne de défense contre les infections virales. Les bactéries ayant montré des effets positifs chez la souris dans le cadre d'infections par le virus de la grippe (réduction des symptômes) ont un profil pro-inflammatoire *in vitro*, notamment par l'induction de cytokines pro-inflammatoires telles que la production d'IL-12. Cette production est dépendante de la reconnaissance des bactéries par les TLR. Pour la souche de *L. plantarum* LpYU, TLR2 semble être impliqué, étant donné qu'il reconnaît le PEG et le LTA des bactéries Gram positives (Kawashima, Hayashi et al. 2011). Nagai *et al.* ont testé dans un modèle murin d'infection virale par un virus de la grippe, les effets immuno-modulateurs d'un yaourt fermenté avec la souche *L. delbrueckii* OLL1073R-1, ainsi que les effets des exopolysaccharides (EPS) produits par cette souche. Ils ont observé des effets immuno-modulateurs du yaourt ainsi que des EPS acides (et non des EPS neutres), permettant de protéger les souris contre la grippe. L'administration orale de la souche *L. plantarum* L-137 (HK-LP) à des souris infectées par le virus de la grippe, a montré une augmentation de la protection contre le virus de la grippe par l'activation de l'immunité innée des souris au début de l'infection par la production de l'IFN de type I. L'élimination complète du virus est médiée par les mécanismes de la réponse immunitaire adaptative et plus particulièrement par les LT cytotoxiques (Maeda, Nakamura et al. 2009).

2.3. Modèles d'étude chez l'homme

Les épidémies de grippe saisonnières sont particulièrement graves chez les personnes âgées. De plus, du fait du déclin du fonctionnement de leurs systèmes immunitaires, ces personnes répondent moins bien aux vaccins par rapport aux adultes et aux enfants.

Nous présenterons dans cette partie quelques études cliniques visant à montrer les bienfaits des probiotiques sur les infections hivernales. Une première étude concerne la souche *L. casei* DN 114-001 testée lors de deux saisons hivernales successives et incluant plus de 300 personnes âgées volontaires ayant reçu un produit fermenté avec la souche citée (2 bouteilles de 100 g/jour) ou du lait acidifié non fermenté comme placebo. La première étude pilote a été menée avec 44 sujets pour le groupe probiotique et 42 sujets pour le groupe

placebo. Ces sujets ont reçu le produit probiotique ou le placebo 4 semaines avant la vaccination avec du Mutagrip et 3 semaines plus tard. La deuxième étude confirmatrice a été menée avec 113 sujets pour le groupe probiotique et 109 sujets pour le groupe placebo. Pour cette étude, les sujets ont reçu le produit probiotique ou le placebo 4 semaines avant la vaccination avec du Vaxigrip et 9 semaines plus tard. Les vaccins utilisés sont différents entre les deux études, de façon à pouvoir inclure dans la deuxième étude les souches de virus identifiées à la saison hivernale précédente. Dans les deux études, les vaccins contenaient le virus atténué H1N1 (souche commune aux deux vaccins) et deux souches différentes de H3N2 et B. Ces études sont aléatoires (le patient recevait au hasard le placebo ou le produit probiotique), multicentriques (réalisées dans différents centres) et réalisées en double aveugle (le médecin et le patient ne savaient pas qui recevait le placebo ou le produit probiotique).

La première étude pilote a montré que les titres en Ac grippe spécifiques, la séroprotection et la séroconversion en réponse à la vaccination étaient plus importantes mais non significatives statistiquement chez les volontaires ayant consommé le produit probiotique en comparaison au produit placebo au bout de 3 semaines post vaccination. Les résultats de cette étude pilote ont été jugés encourageants et ont mené à l'étude de confirmation avec un nombre de sujets et une durée de consommation du produit probiotique (post vaccination) plus importants. Cette deuxième étude a confirmé les effets positifs de la prise du produit probiotique puisque les titres des Ac contre les 3 souches de vaccins ont été augmentés dans le groupe probiotique comparé au groupe contrôle après 3 et 9 semaines post vaccination. La prise de probiotique étant de 9 semaines après la vaccination, l'augmentation en titres des Ac correspond donc à la prise du produit probiotique qui contribue au maintien élevé des Ac après la vaccination. L'effet bénéfique du produit probiotique est confirmé par les analyses de séroprotection et séroconversion. Cet effet est aussi dépendant de la souche de virus, puisque les résultats sont plus prononcés pour les souches H3N2 et B virales (Boge, Remigy et al. 2009).

D'autres souches commercialisées telles que la souche *L. rhamnosus* LGG et la souche *L. johnsonii* La1 ont fait l'objet d'études cliniques, toujours dans le cadre des infections respiratoires. Elles ont été respectivement testées chez des enfants sains fréquentant des centres de soin de jour et chez des personnes âgées hospitalisées. Les études étaient aléatoires, multicentriques et réalisées en double aveugle. L'étude avec la souche LGG a été menée pendant 7 mois durant lesquels les enfants ont consommé du lait contenant ou non la souche LGG à une dose de 5×10^5 UFC/ml. Les résultats ont montré une diminution de 17 % de

l'incidence d'infections respiratoires avec complications chez les enfants ayant consommé le produit probiotique. (Hatakka, Savilahti et al. 2001). Une consommation de 12 semaines de la souche La1 à une dose de 1×10^9 UFC/90g, a contribué à diminuer la durée des infections respiratoires chez les personnes âgées, en renforçant leurs défenses immunitaires (Fukushima, Miyaguchi et al. 2007).

Une autre étude a été menée sur 50 adultes sains vaccinés (25 sujets pour le groupe placebo et 25 pour le groupe probiotique). Ils ont reçu soit des capsules de méthyl-cellulose soit des capsules contenant 1×10^{10} UFC de *L. fermentum* CECT5716 pendant 28 jours avec une vaccination au bout de 14 jours. Le vaccin contenant un mélange des souches H1N1, H3N2 et B. Après les 2 semaines de vaccination, les chercheurs ont noté une augmentation des LT auxiliaires et des LT cytotoxiques chez les sujets des 2 groupes. Ils n'ont pas noté d'augmentation du nombre de cellules NK dans le groupe placebo, mais la consommation journalière du produit probiotique a induit l'augmentation significative des cellules NK 14 jours après la vaccination. Des mesures de cytokines dans le sang ont été réalisées et les résultats ont montré que i) la vaccination n'induisait pas de production d'IL-12 dans le sérum, mais 2 semaines après la prise du probiotique, une augmentation non significative d'IL-12 est observée, ii) la vaccination induit une augmentation du taux de TNF- α dans les 2 groupes mais la prise de probiotique induit plus fortement cette augmentation et iii) pour les cytokines IL-10 et IFN- γ , pas de différence significative entre les 2 groupes, mais une tendance à la production d'INF- γ dans le groupe probiotique a été notée (Olivares, Diaz-Ropero et al. 2007).

Trois souches probiotiques *L. gasseri* PA 16/8, *B. longum* SP 07/3 et *B. bifidum* MF 20/5 figurant dans le produit Bion3 ont fait l'objet d'une étude clinique visant à évaluer l'effet de ces souches sur les infections du tractus respiratoire. Cette étude a été menée sur 479 volontaires sains sur deux saisons hivernales (respectivement 242 et 237 participants). Les souches ont été testées à une dose de 5×10^7 UFC/capsule. Ces capsules contenaient en plus des vitamines et des minéraux, et le placebo ne contenait que les vitamines et minéraux. Les deux produits ont été consommés par les volontaires durant 14 jours en absence de prise d'autres produits probiotiques. La prise du produit probiotique a eu pour effet de diminuer la durée moyenne d'épisodes infectieux de 2 jours en moyenne en comparaison avec le groupe placebo et de réduire la sévérité des symptômes. Il a aussi été noté une augmentation chez les volontaires ayant consommé le produit probiotique du nombre de LT (CD8⁺) cytotoxiques

dénombrés dans le sang ; mais cet effet ne peut être attribué aux souches probiotiques seulement, vu que les capsules contenaient des vitamines et des minéraux qui pourraient avoir des effets immuno-stimulants (de Vrese, Winkler et al. 2006).

3. Probiotiques et inflammation intestinale

Comme leur nom l'indique, les inflammations intestinales touchent l'intestin et causent différentes pathologies chez l'homme. Des études précédentes ont montré que l'apport de certaines bactéries pouvait atténuer ces inflammations.

Dans cette section, après une brève présentation de l'inflammation intestinale, nous traiterons les modèles d'étude des inflammations chez la souris. Nous présenterons ensuite quelques études sur l'effet des probiotiques sur ce genre de maladies menées chez l'homme.

3.1. Inflammation intestinale

L'inflammation peut être définie comme la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression. Une inflammation peut être causée par des agressions physiques (comme le chaud ou le froid), chimiques (composés acides ou basiques). Elle peut aussi être la conséquence d'une infection (en rapport avec la présence dans l'organisme de bactéries pathogènes, virus ou champignons) ou d'origine auto-immune. Le terme MICI regroupe les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Trois formes de MICI sont distinguées i) la maladie de Crohn (MC) lorsque l'inflammation atteint tout segment du tube digestif en créant des lésions profondes, ii) la rectocolite hémorragique (RCH) lorsque l'inflammation est localisée au niveau du rectum et du côlon et iii) la pouchite lorsque l'inflammation touche le réservoir iléal. Du fait de leur caractère chronique, ces maladies se caractérisent par des périodes de poussées inflammatoires durant lesquelles les patients sont pris de diarrhées abondantes, douloureuses et parfois mêmes sanglantes. Les causes de ces maladies ne sont pas encore bien connues, mais elles peuvent être d'origine génétique, immunitaire ou environnementale.

3.2. Modèles d'étude chez l'animal

Différents protocoles expérimentaux ont été mis en place depuis les années 1990 pour simuler des inflammations intestinales chez la souris afin i) d'identifier les facteurs à l'origine de la maladie, ii) de comprendre les mécanismes d'action de l'inflammation et iii) de mettre au point de nouveaux moyens thérapeutiques pour lutter contre les inflammations incluant l'utilisation de souches probiotiques par exemple. La participation du système immunitaire de

l'animal et la prédisposition/fond génétique vont jouer un rôle important dans l'établissement de l'inflammation.

L'inflammation par les polysaccharides sulfatés du DSS induit une colite aigue caractérisée par des diarrhées sanglantes chez la souris. Les souris présentent aussi une perte de poids ainsi qu'un côlon raccourci et un épaissement visible à l'œil nu du côlon. Ce modèle expérimental a été largement utilisé, étant donné que le DSS induit une colite sévère chez la souris en affectant la partie distale du côlon avec une ulcération importante et une perte de la structure en cryptes de l'épithélium intestinal comme montré dans la Figure 20 (Nanda Kumar, Balamurugan et al. 2008).

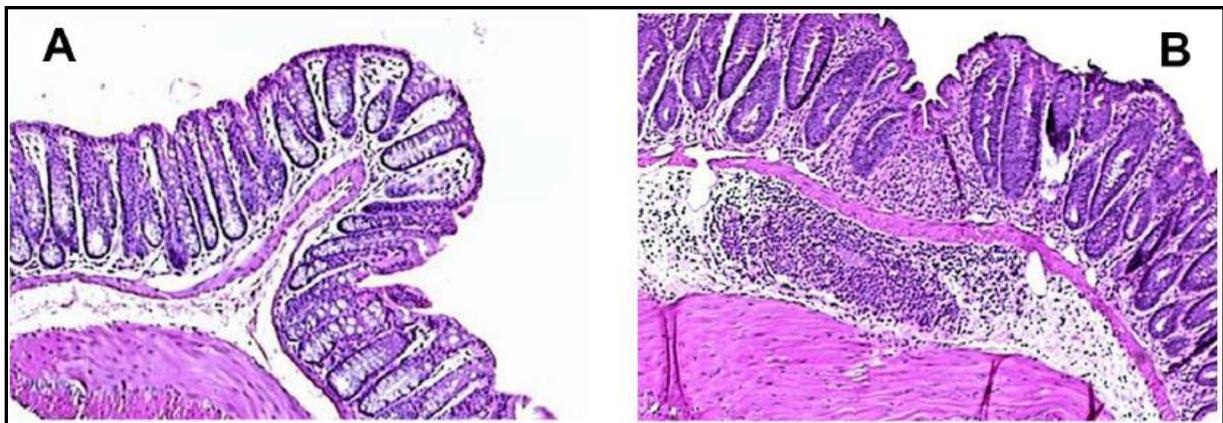


Figure 20: A. Coupes histologiques de côlons de souris saines ou B. traitées au DSS

Une variante à ce modèle consiste à alterner entre l'administration de DSS et d'eau sur quelques jours chez la souris pour mimer une colite chronique. Une autre inflammation peut être induite par le TNBS en l'injectant chez la souris par voie rectale. Il en résulte une inflammation localisée dans le côlon et le rectum. D'autre part, il est possible maintenant grâce à des outils de biologie moléculaire d'inactiver des gènes clés du système immunitaire chez des souris et d'obtenir ainsi des souris knock out (KO-) pour IL-10 (IL-10^{-/-}), par exemple, qui développent spontanément des colites.

De par leur capacité à moduler la production de cytokines et leur aptitude à renforcer la barrière épithéliale, les bactéries probiotiques ont été testées dans le but de réduire l'incidence de l'inflammation. Différents protocoles expérimentaux ont été testés pour étudier cette inflammation ; mais généralement, et après acclimatation, les souris sont gavées pendant une semaine en préventif par les bactéries testées. Le DSS est alors ajouté dans l'eau de

boisson des souris à raison de 1 à 5% et les bactéries administrées pendant une semaine en curatif. Après l'induction de l'inflammation, les souris sont quotidiennement évaluées pour leurs pertes de poids ainsi que la présence de sang dans les fèces et leurs consistances ; la moyenne de ces trois paramètres constitue le « Disease Activity Index » (DAI). Au moment de l'abattage, la longueur des côlons est mesurée et des lames histologiques de côlon sont préparées. Dans le tableau 6, quelques protocoles d'études des propriétés probiotiques de souches bactériennes et les résultats obtenus sont résumés. En général, le traitement probiotique permet de limiter les pertes de poids des souris traitées au DSS. Les cocktails de bactéries testées, montrent un changement de la composition des microbiotes des souris traitées par le DSS et par les bactéries. Ils montrent aussi une augmentation de la taille des côlons, ainsi qu'une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires.

Tableau 6: Différentes conditions d'études de souches bactériennes dans des modèles d'inflammations intestinales chez la souris.

Références	(Nanda Kumar, Balamurugan et al. 2008)	(Miyachi, Morita et al. 2009)	(Mennigen, Nolte et al. 2009)	(Lee, Han et al. 2008)
Bactéries testées	Cocktail de bactéries <i>L. rhamnosus</i> LGG <i>L. plantarum</i> (CIP102021) <i>L. casei</i> (CIP107868) <i>L. lactis</i> (CIP101028) <i>B. bifidum</i> (CIP56.7T) <i>B. infantis</i> (CIP64.67T) <i>B. lactis</i> CIP105265T) <i>B. adolescentis</i> (CIP64.59T)	<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> no. 3, <i>L. casei</i> no. 9 <i>L. gasseri</i> no. 10 <i>L. rhamnosus</i> OLL2838	Cocktail VSL#3 <i>S.thermophilus</i> <i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>L. bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i> HY115 <i>L. brevis</i> HY7401
Induction de l'inflammation	4% DSS intégré dans l'alimentation des souris	3,5% DSS dans l'eau de boisson	3,5% DSS dans l'eau de boisson	5% DSS dans l'eau de boisson
Administration des bactéries par rapport à l'induction de l'inflammation	7 jours avant et 7 jours après	24h après l'induction au DSS, gavages quotidiens pendant 3 jours : bactéries vivantes (10^7 UFC/souris) ou des bactéries tuées par la chaleur	7 jours avant et 7 jours après	7 jours après
Résultats obtenus	- ↓ des bactéries du groupe	- ↓ des effets de la colite par	- ↓ des DAI	- ↓ de l'activité de dégradation des

<p>après l'administration des bactéries</p>	<p>Bactéroïdes chez les souris traitées au DSS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Traitement probiotique restaure les niveaux de Bactéroïdes, et ↑ les niveaux des <i>Bifidobacterium</i> et <i>Lactobacillus</i>. - ↓ des symptômes cliniques, histologiques et biochimiques - ↓ de la sécrétion de TNFα à partir d'un morceau de côlon distal 	<p><i>L. rhamnosus</i> OLL2838 vivante ou tuée par la chaleur</p> <ul style="list-style-type: none"> - de la perte de poids avec les deux formes testées. - ↑ de la longueur des côlons - ↓ de l'activité MPO des morceaux de côlons distaux <p>meilleure avec la bactérie vivante</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ du score histologique - ↑ de la protection de la barrière épithéliale 	<p>sulfates de chondroïtine (protège le cartilage contre les réactions enzymatiques et contre les dommages dus aux radicaux libres) et de l'acide hyaluronique</p>
---	--	---	--	--

Comme montré dans le tableau ci-dessus, il est possible d'étudier des bactéries seules ou un mélange de bactéries. Il a déjà été démontré qu'un mélange de bactéries probiotiques permet de maximiser les effets et de favoriser les synergies entre les bactéries (Chapman, Gibson et al. 2010).

Dans le cadre d'une inflammation par le DSS, le traitement probiotique diminue l'effet inflammatoire mais ne guérit pas la maladie. Les bactéries probiotiques protègent la barrière intestinale en empêchant la réduction de l'expression des protéines des jonctions serrées et en évitant l'apoptose des cellules épithéliales (Mennigen, Nolte et al. 2009). Outre leur capacité à agir directement sur l'épithélium intestinal, les bactéries probiotiques possédant des propriétés anti-inflammatoires ont démontré leurs efficacités sur les inflammations intestinales. Ces bactéries vont activer les cellules immunitaires qui vont i) initier une cascade de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β et ii) freiner la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, l'IL-10 et le TNF- α (Preidis and Versalovic 2009)

Une étude a montré que dans le cadre d'une inflammation au DSS chez la souris, si la souche vivante *L. casei* DN 114-001 avait des effets positifs en diminuant les effets de l'inflammation, son lysat présente des effets similaires sur une inflammation induite avec 3% de DSS. Ce lysat a été administré en préventif et par voie orale pendant 4 semaines à des souris BALB/c et à des souris immuno-déficientes : les « Severe Combined Immunodeficient » mice (SCID). L'effet positif du lysat de la souche DN 114-001 a été observé seulement chez les souris BALB/c. Il est associé avec i) un changement de la composition du microbiote intestinal avec une augmentation des bactéries des groupes *Bacteroides* (de façon non significative) et *Lactobacillus* (de façon significative), ii) la modulation du système immunitaire muco-sal par la diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IFN- γ et de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans le PP, l'iléon, le caecum et le côlon et iii) l'induction de cellules T régulatrices dans le MLN. Cet effet positif du lysat bactérien peut ouvrir la voie au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des maladies inflammatoires chez l'homme (Zakostelska, Kverka et al. 2011).

Bien que les mécanismes d'action des souches bactériennes ayant des effets immuno-modulateurs ne soient pas encore complètement élucidés, les TLR2, TLR4, et TLR9 semblent essentiels dans la médiation des effets anti-inflammatoires des probiotiques (Cario, Gerken et al. 2007) ; (Grabig, Paclik et al. 2006) (Rachmilewitz, Katakura et al. 2004). En effet, dans le

but de comprendre le mécanisme d'action de la souche *E. coli* Nissle 1997 (qui protège des souris contre une inflammation sévère induite avec 5% DSS), Grabig *et al.* ont testé l'administration de cette souche par voie orale et rectale à une dose de 1×10^7 UFC/souris pendant 8 jours à des souris sauvages C57BL/6 et à des souris TLR2^{-/-} et TLR4^{-/-}. Les résultats ont montré que la souche *E. coli* Nissle 1997 atténuait les effets de la colite induite chez les souris sauvages et non chez les souris TLR2^{-/-} et TLR4^{-/-}. Les souris sauvages et les souris TLR2^{-/-} exposées au DSS ont développé une colite aiguë, alors que les souris TLR4^{-/-} exposées au DSS également, ont développé une inflammation significativement moins sévère. Chez les souris sauvages, contrairement aux souris TLR2^{-/-} et TLR4^{-/-}, la souche *E. coli* Nissle 1997 a permis d'atténuer les effets de la colite et de diminuer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IFN- γ , MCP-1 et IL-6. Chez les souris TLR2^{-/-}, et suite à l'administration de la souche *E. coli* Nissle 1997, une réduction de la sécrétion d'IFN- γ a été notée. Il n'y a pas eu de sécrétion de cytokines chez les souris TLR4^{-/-} traitées avec la souche, indiquant que ces souris ne développent pas une colite similaire à celle observée chez les souris sauvages. En conclusion, cette étude a démontré que la souche *E. coli* Nissle 1997 modulait le développement des cellules T et la production de cytokines par des voies de signalisation impliquant TLR2 et TLR4 (Grabig, Paclik *et al.* 2006).

Dans une autre étude, Macho Fernandez *et al.* ont montré que les effets anti-inflammatoires de la souche *L. salivarius* Ls33 dans le cadre d'une inflammation induite par le TNBS étaient portés par la voie de signalisation d'un membre de la famille des NLR : NOD2 (détecte la dégradation des produits du PEG). En effet, pour étudier le rôle de cette voie de signalisation dans le cadre de l'étude des propriétés anti-inflammatoires de Ls33, des souris NOD2^{-/-} ont été utilisées pour leur susceptibilité à l'inflammation en comparaison avec les souris sauvages. Si les effets anti-inflammatoires de la souche Ls33 ont été confirmés chez les souris sauvages par i) la diminution de la perte de poids des souris, ii) la diminution des scores macroscopiques de Wallace, et iii) la diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et CXCL2 et l'augmentation de la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ; ces effets n'ont pas été retrouvés chez les souris NOD2^{-/-} lorsqu'ils ont reçu la souche Ls33. Il a aussi été démontré lors de cette étude que les paramètres de l'inflammation (perte de poids, scores macroscopiques et scores histologiques) ont été significativement diminués par une injection unique et par voie intra péritonéale de 100 μ g de PEG purifié de Ls33. Ces résultats ont été confirmés chez des souris IL-10^{-/-}. Ces résultats ne peuvent évidemment pas être généralisés à toutes les BL. Le PEG d'une souche qui ne montre

pas d'effets immuno-modulateurs ne peut pas avoir un effet modulateur, c'est le cas du PEG de la souche *L. acidophilus* NCFM qui comme la souche dont il dérive ne montre pas d'effet immuno-modulateur dans le cadre d'une inflammation par le TNBS et en comparaison avec la Ls33. L'analyse approfondie du PEG de Ls33 a révélé la présence du muropeptide GlcNAc-MurNAc-L-Ala- γ -D-iGln-L-Lys (M-tri-Lys), qui est absent chez la NCFM et qui pourrait être responsable des effets anti-inflammatoires du PEG de la souche *L. salivarius* Ls33 (Macho Fernandez, Valenti et al. 2011).

3.3. Modèles d'étude chez l'homme

La pochite est une inflammation non spécifique du réservoir iléal. C'est la complication la plus commune, à long terme, après la chirurgie de la colite ulcéreuse. Elle a été récemment associée à une diminution du nombre de lactobacilles et de bifidobactéries, laissant penser que ce syndrome peut être le résultat d'un microbiote instable. C'est dans ce cadre que le produit probiotique VSL#3 contenant 8 souches bactériennes (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* et *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) a été testé chez des patients en rémission atteints de pochites chroniques et récidivantes (au moins 3 fois/an). Les patients ont consommé pendant 9 mois par voie orale deux fois par jour soit 3g contenant 5×10^{11} de bactéries viables lyophilisées par gramme de produit VSL#3/jour (20 patients), soit 3g d'amidon de maïs/jour (20 patients). Avant le début de l'étude, tous les patients ont reçu un traitement antibiotique journalier pendant un mois (1 g de ciprofloxacine et 2 g de rifaximine). L'étude était aléatoire, multicentrique et réalisée en double aveugle.

Sur les 20 patients ayant reçu le placebo, tous avaient rechuté à différents temps (8 dans les 2 mois, 7 dans les 3 mois, et 5 dans les 4 mois). Par contre, sur les 20 patients traités avec le VSL#3, 17 patients (85%) étaient toujours en rémission au bout de 9 mois; les 3 autres avaient des rechutes dans les 4 mois suivant le traitement, et la durée médiane de rémission était de 2 mois.

Chez les patients traités avec le VSL#3, les concentrations fécales des lactobacilles, bifidobactéries, et streptocoques ont augmenté significativement en comparaison à des concentrations présentes avant et après antibiothérapie et sont restées stables tout au long de l'étude. Aucun changement significatif n'a été enregistré pour les concentrations des Bactéroïdes, des coliformes, des clostridies, des entérocoques, ainsi que pour les bactéries aérobies et anaérobies totales par rapport aux niveaux de base. Un mois après l'arrêt du

VSL#3, les concentrations fécales de lactobacilles, bifidobactéries, et streptocoques avait atteint des niveaux semblables à des niveaux de base à nouveau. Dans le groupe traité avec le placebo, les concentrations fécales de toutes les espèces évaluées sont demeurées similaires à tous les niveaux de celles mesurées avant le traitement antibiotique (Gionchetti, Rizzello et al. 2000).

Cette étude montre bien que l'administration orale de VSL#3 a été efficace dans la prévention des rechutes chez les patients avec une pouchite chronique; l'efficacité de ce produit probiotique pourrait être liée à l'augmentation des concentrations de bactéries protectrices au niveau du microbiote des patients. L'efficacité du produit probiotique pourrait être attribuée à i) la forte concentration bactérienne contenue dans 3 g de produit (300 milliards de bactéries viables par gramme) et ii) à la présence de différentes espèces bactériennes qui agiraient en synergie pour supprimer les bactéries pathogènes potentielles.

4. Probiotiques et stress oxydant

De nombreuses études menées sur l'implication du stress oxydant dans diverses pathologies (dont des pathologies intestinales) ont montré l'intérêt d'étudier les effets des souches bactériennes probiotiques et anti-oxydantes afin de traiter ce déséquilibre physiologique.

Après une description du stress oxydant et de ses effets, nous présenterons des études réalisées chez l'animal et chez l'homme visant à montrer les effets bénéfiques de souches de BL sur ce genre de stress.

4.1. Stress oxydant

Le stress oxydant se développe lorsqu'il y a une accumulation d'espèces oxydantes dans la cellule ; ces espèces oxydantes sont principalement des dérivés actifs oxygénés (DAO). Cet état de stress résulte d'une sur-production de DAO ou d'une carence au niveau des systèmes de défense de la cellule (Farr and Kogoma 1991; Lin and Yen 1999).

Les DAO sont des composés moléculaires toxiques parmi lesquels on peut citer l'ion superoxyde (O_2^\ominus), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\ominus). Instables et très réactifs, ils peuvent provenir de l'environnement extérieur comme l'exposition prolongée au soleil, à l'ozone, au tabagisme, à certains produits chimiques (médicaments, herbicides, polluants), consommation d'alcool, aux métaux toxiques (chrome, nickel ou cobalt). Ils sont

aussi produits en continu au sein de l'organisme dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques et principalement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Farr and Kogoma 1991; Lin and Yen 1999).

En effet, lors de la respiration, il y a transformation de l'oxygène en deux molécules de H₂O par les enzymes de la chaîne respiratoire. Cette réaction libère des intermédiaires tels que l'O₂^{•-} et H₂O₂. D'autre part, certains facteurs exogènes comme le fer ou le cuivre peuvent jouer le rôle de catalyseur et favoriser l'apparition des DAO. Cette oxydation est appelée réaction de Fenton $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\circ$. Même si leur durée de vie est limitée et qu'ils ne s'attaquent pas aux mêmes cibles, les DAO causent généralement des dommages au niveau i) de l'ADN, ii) des protéines et iii) des lipides (Storz and Imlay 1999).

Les dommages causés par l'ion superoxyde O₂^{•-} sont divers, les mieux décrits sont i) l'inactivation des enzymes par la réduction des métaux de transition (Flint, Tuminello et al. 1993) ii) la déstructuration des protéines (van de Guchte, Serror et al. 2002), iii) l'auxotrophie des acides aminés aromatiques, (Benov and Fridovich 1999) et iiiii) la formation de OH[°] hautement toxique pour la cellule (Storz and Imlay 1999).

H₂O₂ génère aussi différents dégâts du fait de sa stabilité et sa capacité à diffuser passivement à travers la membrane plasmique. Il participe à la formation du radical OH[°] lors de la réaction de Fenton et cause des dégâts même à de faibles concentrations, de l'ordre de 10 μM, en inhibant la croissance cellulaire (Kohen and Nyska 2002).

Le radical OH[°], avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est le plus instable et le plus réactif de tous les DAO. Cependant sa diffusion limitée lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L'OH[°] apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des DAO (Farr and Kogoma 1991).

Dans une cellule, le maintien d'un niveau non cytotoxique de DAO est assuré par des systèmes anti-oxydants enzymatiques ou non-enzymatiques. Un dysfonctionnement de ces systèmes engendre des dommages cellulaires et tissulaires. Ainsi, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), les glutathion-peroxydases (GPx) et la NADH peroxydase constituent le système enzymatique anti-oxydant. Ces enzymes constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les DAO.

La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\circ-}$ en H_2O_2 . Elle existe sous trois isoformes différents par leur localisation cellulaire mais aussi par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc Cu/Zn-SOD, une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu (Zelko, Mariani et al. 2002).

La CAT réduit H_2O_2 en H_2O et $O_2^{\circ-}$. Il existe des CAT héminiques contenant un groupe prosthétique protoporphyrine-fer dans leur site actif et des CAT à manganèse qui fixent du manganèse dans leur site actif (Kohen and Nyska 2002).

La glutathion peroxydase et la NADH peroxydase sont des peroxydases qui réduisent H_2O_2 en H_2O à l'aide d'un cofacteur, respectivement le glutathion et le NADH. Les GPx ont été les premières peroxydases à thiol découvertes, leur activité inclue la résistance au stress oxydant. Le glutathion est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) présent dans la cellule à des concentrations de l'ordre du millimolaire, et fait donc partie des anti-oxydants les plus importants. C'est un composé redox qui peut être présent soit sous forme réduite (GSH) soit sous forme oxydée (GSSG). L'oxydation du GSH en GSSG fait intervenir la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre les résidus cystéines de deux molécules. Le couple GSH/GSSG participe activement à la réduction des peroxydes par le biais de GPx qui utilisent le GSH comme donneur d'électrons. La forme oxydée GSSG peut être réduite en deux molécules de GSH par l'action d'une enzyme à FAD NADPH-dépendante, la glutathion réductase (Ursini, Maiorino et al. 1995; Pastore, Federici et al. 2003).

Parallèlement à ces systèmes enzymatiques catalysant l'élimination des SOD, il existe d'autres modes de détoxification non enzymatiques parmi lesquels nous pouvons citer l'élimination du $O_2^{\circ-}$ par la présence de manganèse intracellulaire, et l'apport extérieur de vitamines A, C et E ou d'oligoéléments comme le sélénium (Machlin and Bendich 1987; Valko, Izakovic et al. 2004).

4.2. Modèles d'étude chez l'animal

Dans les maladies inflammatoires de l'intestin, l'activation soutenue du système immunitaire entraîne un stress oxydant au niveau du TD ainsi qu'une perte de l'homéostasie intestinale. Dans le cas des MICI, un excès de DAO a été observé au niveau du TD. Cette observation a encouragé l'étude des bactéries probiotiques anti-oxydantes pour le traitement de ces dysfonctionnements intestinaux. En effet, ces bactéries pourraient i) résister au stress

oxydant et survivre au transit pour exercer leurs effets bénéfiques, et ii) limiter les dommages causés par l'inflammation en éliminant les DAO produits dans le TD.

Rochat *et al.* ont testé une souche de BL, *L. casei* BL23 produisant ou non une CAT manganèse-dépendante MnKat (produite naturellement par *L. plantarum* ATCC14431). Ces bactéries (BL23 MnKat⁺ et BL23 MnKat⁻) ont été administrées par gavages quotidiens (5x10⁹ UFC/ml) un jour avant l'induction de l'inflammation et 9 jours plus tard. L'inflammation, chez des souris conventionnelles BALB/c mâles élevés en isolateur, a été induite par 1% DSS dans l'eau de boisson. Les résultats ont montré que l'administration des deux souches de BL23 a conduit à une baisse significative des scores macroscopiques et histologiques indépendamment de la présence ou non de catalase. De plus, il n'y a pas de variation des cytokines pro- ou anti-inflammatoires suite à l'administration du DSS ou des bactéries testées. Le taux de peroxydation des lipides a été estimé par le dosage des malondialdéhydes (MDA, produit en parallèle à la peroxydation des lipides) au niveau des parois du caecum et du côlon, mais les auteurs n'ont pas noté de différence entre les lots témoins, ni chez les lots recevant les deux bactéries. Le dosage de l'activité CAT totale sur les lysats de contenus intestinaux n'a pas montré de différence entre les souris ayant reçu le DSS ou le DSS en présence des deux bactéries. En outre, l'apport de MnKat par la bactérie BL23 MnKat⁺ ne permet pas d'augmenter l'activité catalase totale mesurée dans les contenus intestinaux. Il a été précédemment montré *in vitro*, que la souche BL23 MnKat⁺ permettait l'élimination de H₂O₂ dans son environnement. Dans les conditions de l'étude, l'effet protecteur de la CAT n'a pas pu être identifié. Ce résultat pourrait être du i) au choix du modèle de colite modérée qui ne permettrait pas l'induction d'un réel stress oxydant, ou ii) la faible activité de la CAT délivrée dans le TD par la bactérie BL23 MnKat⁺ (Rochat, Bermudez-Humaran et al. 2007).

Dans une autre étude, Watterlot *et al.* ont voulu déterminer si la supplémentation en SOD pouvait augmenter l'effet anti-oxydant de la souche *L. casei* BL23 MnKat⁺. Pour cela, ils ont cloné une SOD à manganèse (MnSOD) issue de *L. lactis* MG1363 dans la souche *L. casei* BL23 (BL23 MnSOD⁺). L'association de ces deux souches (BL23 MnKat⁺ et BL23 MnSOD⁺) a été ensuite administrée (2 jours avant l'induction de l'inflammation et 7 jours plus tard) à des souris conventionnelles BALB/c mâles élevés en isolateur, traitées au DSS 3%. Les auteurs ont montré que l'administration de BL23 MnSOD⁺ seule ou en association avec BL23 MnKat⁺ permet de réduire significativement l'inflammation induite au DSS par la préservation de l'intégrité de l'épithélium intestinal, la prévention des dommages causés aux cryptes et la diminution d'infiltrations lymphocytaires. Il en résulte donc que la CAT

n'augmente pas le niveau de protection dans un modèle murin de colite induite au DSS 3% et que l'effet anti-inflammatoire observé pourrait être attribué à la SOD (Watterlot, Rochat et al. 2010).

L'étude de souches recombinantes véhiculant des enzymes anti-oxydantes semble être idéale pour comprendre les mécanismes d'action des bactéries probiotiques anti-oxydantes. Malheureusement, ces bactéries ne pourront pas être utilisées dans l'immédiat à des fins thérapeutiques en Europe à cause de la législation régissant les OGM.

D'autres études ont porté sur la souche *L. fermentum* Me-3, identifiée *in vitro*, pour i) son activité anti-microbienne dirigée principalement contre les bactéries G-, ii) sa résistance aux DAO et iii) son activité anti-oxydante avec production de Mn-SOD (Kullisaar, Zilmer et al. 2002). Cette souche a donc été testée dans le cadre d'un modèle murin de fièvre typhoïde induite par *S. typhimurium*. Les souris témoin ont reçu soit *S. typhimurium* avec un fluoroquinolone (ofloxacin) soit *S. typhimurium*, l'ofloxacin et *L. fermentum* Me-3 lyophilisée à une dose de 5×10^7 UFC/ml pendant 8 jours. Les résultats ont montré que chez les souris témoin, il n'y a pas eu éradication de *S. typhimurium* dans l'iléon, le sang et le foie. En revanche, chez les souris traitées avec la souche anti-oxydante, il n'y avait pas de trace de *S. typhimurium* dans les sites mentionnés. De plus, il y a eu prévention de la formation de granulomes dans les rates et réduction de la formation de granulomes dans le foie. Les effets anti-oxydants de la souche Me-3 ont été confirmés par une diminution de la peroxydation des lipides au niveau de la muqueuse iléale, observée chez les souris traitées avec cette souche (Truusalu, Mikelsaar et al. 2008).

4.3. Modèles d'étude chez l'homme

Il est difficile d'observer les effets des probiotiques sur la santé des personnes saines, mais il existe quelques études réalisées sur des volontaires sains. Si un probiotique est capable d'induire une fonctionnalité positive sur les indices relatifs au stress oxydant, il aidera à stabiliser et promouvoir le potentiel des systèmes de défense anti-oxydants, même en absence de symptômes cliniques.

Par exemple, l'efficacité de la souche *L. fermentum* Me-3 a été testée chez des volontaires sains. Cette souche a été identifiée comme souche anti-oxydante suite à des essais *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Kullisaar, Zilmer et al. 2002; Mikelsaar and Zilmer 2009).

Les effets de la souche ont été évalués sur des marqueurs de stress oxydant humains. Pour cela, la souche a été testée dans deux matrices différentes. La première est constituée de lait de chèvre fermenté avec la souche Me-3 mais aussi les souches *L. plantarum* LB-4 (souche productrice d'exo polysaccharides qui donnent au lait fermenté une consistance crémeuse) et *L. buchneri* S-15 (souche qui a la capacité de diminuer le goût spécifique du lait de chèvre). La deuxième matrice utilisée est constituée de capsules contenant 1×10^9 UFC de Me-3 dans 250 mg de saccharose et micro cellulose, le placebo ne contient que les deux derniers éléments cités.

Le groupe de volontaires recevant le lait fermenté est constitué de 21 personnes (16 personnes ont reçu le produit probiotique et 5 personnes ont reçu le placebo). Le groupe recevant les capsules est composé de 24 personnes, la moitié ayant reçu 3 capsules de probiotiques 2 fois par jour et l'autre moitié a reçu les mêmes quantités de capsules placebo. L'étude a été randomisée, multicentrique et réalisée en double aveugle.

Les marqueurs de l'oxydation dosés sont l'activité totale anti-oxydante (TAA, « total antioxidative activity ») qui reflète l'état de la fraction lipidique dans les systèmes de défense anti-oxydants du sang, le statut anti-oxydant total (TAS, « total antioxidative statut ») qui représente le pouvoir anti-oxydant de la fraction soluble dans l'eau et dans le sang et le ratio glutathion GSH/GSSG.

Les résultats ont montré que dans les deux groupes d'études (lait fermenté et capsules), la consommation régulière pendant 3 semaines a permis l'augmentation du nombre total de lactobacilles dans les fèces en comparaison avec les taux identifiés avant le début de l'essai. Cette augmentation n'a pas été observée pour les deux groupes placebo. Des effets positifs sur les marqueurs de stress oxydant TAA et TAS ont été observés pour les volontaires ayant reçu les deux formules. Cependant la consommation du lait fermenté avec la souche Me-3 induit un effet significatif plus important que la consommation des capsules contenant la même souche. Concernant le ratio glutathion GSH/GSSG, une diminution significative a été notée chez les volontaires ayant reçu le lait fermenté mais aussi pour le groupe placebo. Lorsque la souche était consommée dans les capsules, une diminution significative de ce paramètre n'a pas été constatée. La raison qui pourrait expliquer le fait que l'effet anti-oxydant de la souche Me-3 est plus visible lorsqu'il est dans la matrice laitière est que le lait contient du lactose, des minéraux, des vitamines et autres composants qui augmenteraient

l'activité métabolique de la souche probiotique lorsqu'elle est ingérée dans le TD (Songisepp, Kals et al. 2005).

D'autres études ont testé non pas des bactéries, mais des enzymes anti-oxydantes dans le cadre d'études cliniques. Chez des patients atteints de MC et RCH, la SOD a été administrée dans des capsules de liposomes (2,5 mg ; deux fois par semaine). Les auteurs ont montré que les 4 patients atteints de MC étaient en rémission suite au traitement expérimental et que sur 4 patients atteints de RCH, 3 étaient en rémission après le même traitement (Niwa, Somiya et al. 1985). D'autres chercheurs ont procédé à un essai clinique de phase II sur 26 patients atteint de MC sévère qui ont reçu en traitement la Cu/Zn SOD d'origine bovine (8 mg/jour, associée à 500 mg de desferroxamine injectés par voie sous-cutanée tous les 2 jours) pendant 8 ans. Les résultats ont montré que sur les 26 patients, i) 12 étaient en bonne santé et n'ont pas fait de rechute, ii) 9 patients ont eu une ou plusieurs rechutes et ont montré des réponses positives à la reprise du traitement, et ii) 5 patients n'ont pas répondu au traitement. Ces résultats bien qu'encourageants n'ont pas été confirmés par la suite (Emerit, Pelletier et al. 1991).

Dans le but de tester si les bactéries probiotiques anti-oxydantes pouvaient aider à diminuer les effets du diabète de type 2, 60 patients atteints de diabète de type 2 ont fait l'objet d'une étude clinique randomisée, multicentrique et réalisée en double aveugle. Une semaine avant le début de l'étude, les patients ont arrêté de consommer les produits laitiers. Ils ont ensuite reçu soit 300g de yaourt normal contenant les souches traditionnelles *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* (groupe placebo), soit 300g/jour de yaourt probiotique contenant en plus des souches mentionnées, les souches *L. acidophilus* La5 et *B. lactis* BB12 (groupe probiotique) pendant six semaines. Les résultats de cette étude ont montré que dans le groupe probiotique, une diminution de la glycémie a jeun a été observée, ainsi qu'une augmentation des activités SOD et GPx érythrocytaires. Cependant l'activité de la CAT érythrocytaire n'a pas montré de variation entre les deux groupes. Les auteurs ont aussi noté chez le groupe probiotique une augmentation du TAS. Enfin, une augmentation des MDA dans le sang a été observée chez les deux groupes (Ejtahed, Mohtadi-Nia et al. 2011).

Une autre étude a testé l'effet d'un produit probiotique sur le stress oxydant chez des athlètes durant une période de 4 semaines d'activité physique intense. Les souches *L. rhamnosus* IMC 501 et *L. paracasei* IMC 502 ont été testées lyophilisées à une dose de 10⁹

UFC/g de produit chez 24 volontaires sains (12 volontaires pour le groupe probiotique et 12 volontaires pour le groupe placebo qui n'ont pas consommé de complément alimentaire durant la période de l'étude) pendant 4 semaines. Cette activité physique intense est source de DAO, mais aussi d'un potentiel stress oxydant chez les athlètes, confirmé par le dosage des métabolites réactifs oxygénés dans le sang des athlètes des deux groupes. Ces 2 souches ont montré un effet anti-oxydant *in vitro* par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique et des lipides. Le dosage du potentiel biologique anti-oxydant a montré une augmentation après l'exercice physique chez le groupe probiotique et au contraire, une diminution chez le groupe placebo après le même exercice physique. Ces résultats indiquent que la prise de probiotique neutralise les DAO ainsi que le stress oxydant (Martarelli, Verdenelli et al. 2011).

V. PRESENTATION DU PROJET

L'OMS définit les probiotiques comme des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé au-delà des effets nutritionnels traditionnels. Les probiotiques sont généralement des BL ingérées par les consommateurs sous forme de produits laitiers fermentés ou de compléments alimentaires. Les effets démontrés des probiotiques concernent différents champs d'action, tels que i) l'atténuation des symptômes dus à l'intolérance au lactose, ii) la prévention des diarrhées associées aux antibiotiques ou encore iii) la réduction des allergies. L'effet bénéfique des probiotiques étant souche dépendant, il est donc nécessaire de tester plusieurs souches bactériennes afin d'identifier des souches intéressantes.

L'objectif de ma thèse a été d'identifier des souches immuno-modulatrice *in vitro* puis de confirmer leurs propriétés dans le cadre i) d'une infection par un virus de la grippe *in vivo* et ii) d'une inflammation intestinale induite *in vivo* par le DSS. Un autre objectif de ma thèse a été d'identifier une souche anti-oxydante sur la base d'essais *in vitro* et *in vivo*.

Afin de répondre à ces objectifs, il a fallu dans un premier temps mettre au point les protocoles de criblage *in vitro* des propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes des souches de notre collection. Dans un second temps, pour la confirmation des propriétés des souches candidates, nous avons mis au point différents modèles d'étude *in vivo* des propriétés citées.

MATERIELS

&

METHODES

I. Souches bactériennes et conditions de croissance

Dans le cadre de ce projet, nous avons constitué une collection regroupant 158 bactéries et comprenant majoritairement de BL. Les genres bactériens ainsi que les conditions de culture des souches testées sont présentées dans le tableau 7. La totalité des souches constituant la collection est présentée en annexe 1.

Le choix de ces souches s'est fait suite à une recherche bibliographique sur les espèces à propriétés immuno-modulatrices connues, ainsi que des espèces qui avaient jusqu'à présent été peu étudiées. Nous avons aussi choisi d'analyser des souches appartenant à différents genres bactériens. Les bactéries probiotiques les plus connues et les plus utilisées en industrie, sont des lactobacilles et des bifides. Cependant, de plus en plus de recherches montrent que le genre *Lactococcus* présente aussi des propriétés probiotiques (Kimoto, Mizumachi et al. 2004). C'est pourquoi nous avons inclus des souches de lactocoques dans notre collection.

Les souches de la collection proviennent en majeure partie du Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM, INRA de Rennes), qui préserve et valorise la biodiversité microbienne de souches d'intérêt alimentaire. Le CIRM propose des souches caractérisées au niveau de leur biotope, du lieu et de l'année de leur isolement (lorsque l'information est disponible). Dans le choix des souches de notre collection, nous avons privilégié des souches différentes pour les critères biotope et lieu d'isolement.

D'autres souches académiques faisant partie de la collection de notre équipe sont utilisées comme témoins. Certaines de ces souches sont des souches de référence comme les souches résistantes au stress oxydant *L. casei* BL23 MnKat^{+/-} (Rochat, Bermudez-Humaran et al. 2007) et *L. lactis lactis* SpOx/J60011 (Rochat, Gratadoux et al. 2005).

De même, nous avons étudié d'autres souches isolées au sein de notre équipe, qui ne sont pas encore répertoriées dans des collections connues et n'ont pas été caractérisées pour leurs propriétés. Et à la demande de nos partenaires académiques du GPMA, nous avons testé quelques souches modèles utilisées couramment dans leurs recherches.

Nous avons aussi ajouté à notre collection des souches industrielles provenant d'un producteur de ferments indépendant (Sacco, Italie). Cette collection comprend également des souches connues pour avoir des propriétés immuno-modulatrices avérées (publiées ou communiquées précédemment par d'autres équipes) comme la souche *L. salivarius* Ls33

(Macho Fernandez, Valenti et al. 2011) ou la souche *L. delbruckii* CNRZ 327 (Santos Rocha, Lakhdari et al. 2011). D'autres souches, déjà commercialisées, ne pourront pas être utilisées à terme dans les produits qui découleront du projet, mais nous permettent de disposer de référents déjà caractérisés pour la validation de nos tests.

Tableau 7 : Composition de la collection bactérienne et conditions de culture

Genres bactériens	Nombre de souches	Milieu de croissance	Température de croissance
<i>Lactobacillus</i>	90	MRS	37°C
<i>Lactococcus</i>	31	M17 + lactose	30°C
<i>Bifidobacterium</i>	31	MRS + cystéine	37°C en anaérobiose
<i>Streptococcus</i>	3	M17 + lactose	30°C
<i>Pediococcus</i>	2	MRS	37°C
<i>Bacillus</i>	1	LB	37°C avec agitation

Lors des différentes expériences réalisées, ces bactéries ont toujours été étudiées en phase stationnaire. Nous considérons que les bactéries sont en phase stationnaire après une culture d'une nuit dans un milieu liquide.

II. Etude des propriétés immuno-modulatrices des souches de la collection *in vitro*

Les propriétés immuno-modulatrices des souches de la collection ont été étudiées avec deux modèles cellulaires différentes : des cellules sanguines mononucléaires sanguines (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) et la lignée épithéliale HT-29 (cellules cancéreuses issues du tissu épithélial du côlon humain). Nous décrivons dans cette partie les protocoles expérimentaux utilisés pour les co-incubations avec les souches bactériennes.

1. Criblage avec les cellules sanguines PBMC

Le principe de ce criblage consiste à co-incuber les bactéries avec les PBMC, pendant 24 heures. Puis de mesurer les concentrations en IL-10 et IL-12p70 produites par les PBMC. Pour la phase de criblage, nous avons utilisé des PBMC commerciaux (Stem/Allcells, USA) provenant du même donneur (homme américain, caucasien, âge connu < 65 ans, indice de masse corporelle < 30, non fumeur, pas de prise d'anti-inflammatoires 15 jours avant la prise de sang, HIV et hépatites A et B négatifs, absence de champignons et de bactéries dans le sang collecté).

Cependant pour la phase de confirmation des propriétés immuno-modulatrices des souches, nous avons utilisé des PBMC provenant de 5 donneurs différents (mêmes caractéristiques d'état sanitaire, hommes, américains, caucasien, asiatique, hispanique et afro-américain).

Après réception, les PBMC sont stockées dans des vapeurs d'azote liquide jusqu'à leur utilisation. Pour préparer les PBMC pour les expériences de co-culture avec les bactéries, les cellules sont d'abord décongelées dans un bain marie à 37°C. Elles sont ensuite transférées dans du milieu RPMI-1640 (Lonza, Suisse) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté par la chaleur (1heure à 55°C), 1% L-glutamine (2mM final) et 0,1% du mélange pénicilline/streptavidine (10 U/ml). Nous ajoutons à ce mélange 0,03 ml de DNase (10 mg/ml) pour éviter l'agglutination. Les cellules sont ensuite centrifugées à 200g pendant 15 minutes, puis remises en suspension, à nouveau centrifugées et remises en suspension, puis comptées en utilisant une cellule de Mallasez et du bleu de trypan.

Les cellules sont ensuite réparties dans les puits d'une plaque à 24 puits à une concentration de 1×10^6 cellules/puits dans un volume de 1 ml de milieu (RPMI supplémenté).

Les bactéries issues d'une culture d'une nuit en milieu liquide sont lavées dans du PBS, puis leur DO est ajustée à 1 dans du tampon « Phosphate Buffered Saline » (PBS). Elles sont ensuite ajoutées aux cellules à une multiplicité d'infection (MOI) de 10 :1 dans 20µl de PBS. Après dépôt des bactéries en triplicat sur les plaques, elles sont incubées pendant 24 heures dans une étuve à 37°C dans une atmosphère avec 10% de CO₂.

Les surnageants de co-culture sont ensuite transférés sur des plaques deepwell et gardés à -80°C pour le dosage ultérieur des concentrations en IL-10 et IL-12p70 par ELISA (Biolegend, USA) selon les recommandations du fabricant. Les échantillons sont testés en duplicat. Chaque bactérie a été testée au cours de 3 co-incubations indépendantes.

2. Criblage avec la lignée épithéliale HT-29

Le principe de ce criblage consiste à co-incuber les bactéries avec les HT-29 stimulées ou non par du TNF- α , pendant 6 heures. Puis de mesurer les concentrations en IL-8 produites par les HT-29.

Les cellules HT-29 d'origine humaine sont cultivées dans des puits de plaques 24 puits pendant une semaine avant les essais de co-incubation. Les plaques 24 puits sontensemencées avec 0,5 ml d'une suspension à 0,1x10⁶ cellules/ml. Le milieu de culture des cellules est composé de « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM, Lonza, Suisse) supplémenté avec 10 % de SVF décomplémenté par la chaleur (1 heure à 55°C), et 1% L-glutamine (2 mM final). Les cellules sont incubées une semaine à 37°C dans une atmosphère à 10% CO₂. Le milieu de culture des cellules est renouvelé tous les jours.

La veille de l'essai, le milieu de culture des cellules est changé pour un milieu contenant du DMEM avec 5% de SVF décomplémenté par la chaleur, et 1% L-glutamine.

Le jour de l'essai, les cellules sont stimulées avec du TNF α (5 ng/ml, Peprotech, USA). Les bactéries sont lavées dans du DMEM supplémenté et leur DO est ajustée à 0,3 dans le DMEM. Elles sont ajoutées aux cellules à une MOI de 40 :1 dans 50µl de DMEM. Les plaques de co-incubation sont ensuite incubées pendant 6 heures à 37°C et à 10% de CO₂.

Les surnageants de co-culture sont transférés sur des plaques deepwell et gardés à -80°C pour le dosage ultérieur des concentrations en IL-8 par ELISA (Mabtech, Sweden) selon les recommandations du fabricant. Les échantillons sont analysés en duplicat. En parallèle, les plaques de 24 puits contenant les tapis cellulaires sont lavés une fois au PBS et congelées au sec pour un dosage ultérieur des protéines par la technique de Bradford pour vérifier l'homogénéité des puits. Chaque bactérie a été testée au cours de 3 co-incubations indépendantes.

III. Etude des résistances au stress des souches de la collection *in vitro*

L'étude de la résistance aux stress des souches de la collection a une double fonction. Elle nous permettra en effet d'identifier des souches bactériennes potentiellement anti-oxydantes, mais aussi de vérifier que les souches immuno-modulatrices supporteront le passage dans le TD lors des essais *in vivo*. Le principe général de ces tests est d'exposer les souches en phase stationnaire à un choc stressant, puis de vérifier l'impact de ce stress sur leur croissance.

Dans le but d'identifier des souches fonctionnelles anti-oxydantes, nous avons choisi de tester la résistance des souches de la collection à un stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou le paraquat. Nous partons de l'hypothèse qu'une souche qui résiste au stress oxydant, pourrait avoir des propriétés anti-oxydantes. En parallèle, nous avons choisi de tester la résistance des souches à un stress induit aux sels biliaires (SB) pour s'assurer que les souches qui seront testées par la suite *in vivo* résisteront au passage dans le TD des souris, mais aussi de l'homme (dans le cadre d'une utilisation industrielle de la souche qui sera identifiée).

Des travaux précédents menés au sein de notre équipe ont montré que les bactéries résistaient différemment aux stress selon si elles étaient en phase exponentielle ou en phase stationnaire (Rochat, Gratadoux et al. 2005). Nous avons fait le choix de tester toutes nos souches en phase stationnaire afin de se rapprocher le plus possible des conditions utilisées en industrie pour la préparation de produits à base de lait fermenté.

L'étude de la résistance de souches bactériennes à de tels stress n'est pas une première au sein du laboratoire. Habituellement, la résistance aux stress était étudiée en étalant les souches stressées ou non sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture gélosé en utilisant un appareil ensementeur Spiral (Spiral system, Interscience, France). L'échantillon, dilué grâce au dilueur gravimétrique est déposé à la surface d'une boîte de Pétri suivant une spirale d'Archimède logarithmiquement décroissante en concentration. Cette technique, bien qu'efficace, ne permet pas d'avoir des résultats rapidement vu qu'il faut attendre l'apparition des colonies sur les boîtes, ce qui prend généralement 48 heures. De plus, comme nous partons d'un nombre important de souches à tester, nous avons opté pour une technique plus « haut débit » et mieux adaptée à nos criblages, à savoir un suivi de la croissance des bactéries sur des plaques 384 puits afin d'étudier plusieurs souches en même temps et d'avoir une réponse rapide. Si la croissance des bactéries sur plaques 96 puits est bien une technique employée depuis plusieurs années (Champagne, Gaudreau et al. 1999; Wang, Li et al. 2009),

il n'en est pas de même pour les plaques 384 puits. Après une phase de mise au point, nous avons validé la croissance des souches en utilisant différentes dilutions à l'aide d'un lecteur de plaques permettant de lire la DO à 600 nm tout en disposant de fonctions d'agitation et de contrôle de température (Spectrafluorplus, Tecan, France). Les mesures de DO sont prises toutes les 15 minutes pendant 19 heures et les plaques sont agitées avant la prise de la mesure. Chaque souche est testée en phase stationnaire et à partir de trois cultures bactériennes différentes. Pour mettre au point le protocole que nous utiliserons pour le criblage de notre collection de bactéries, nous avons étudié la résistance des souches de la collection à 2, 5 et 10 mM de H₂O₂ (Sigma, France) (Rochat, Gratadoux et al. 2005) et à 10 ou 20 mM de paraquat (Sigma, France) (Kullisaar, Zilmer et al. 2002) pendant 10, 30 ou 60 minutes. Pour l'essai de résistance des souches aux SB, nous avons utilisé une concentration de 0,05% citée par Bron et al. (Bron, Marco et al. 2004). La solution de sels biliaries préparée est un mélange de sodium cholate et de sodium déoxycholate (Sigma, France) à 0,05%. Le protocole expérimental utilisé pour l'étude des résistances des souches stressées (S) et non stressées (NS) de notre collection, est présenté dans la Figure 21.

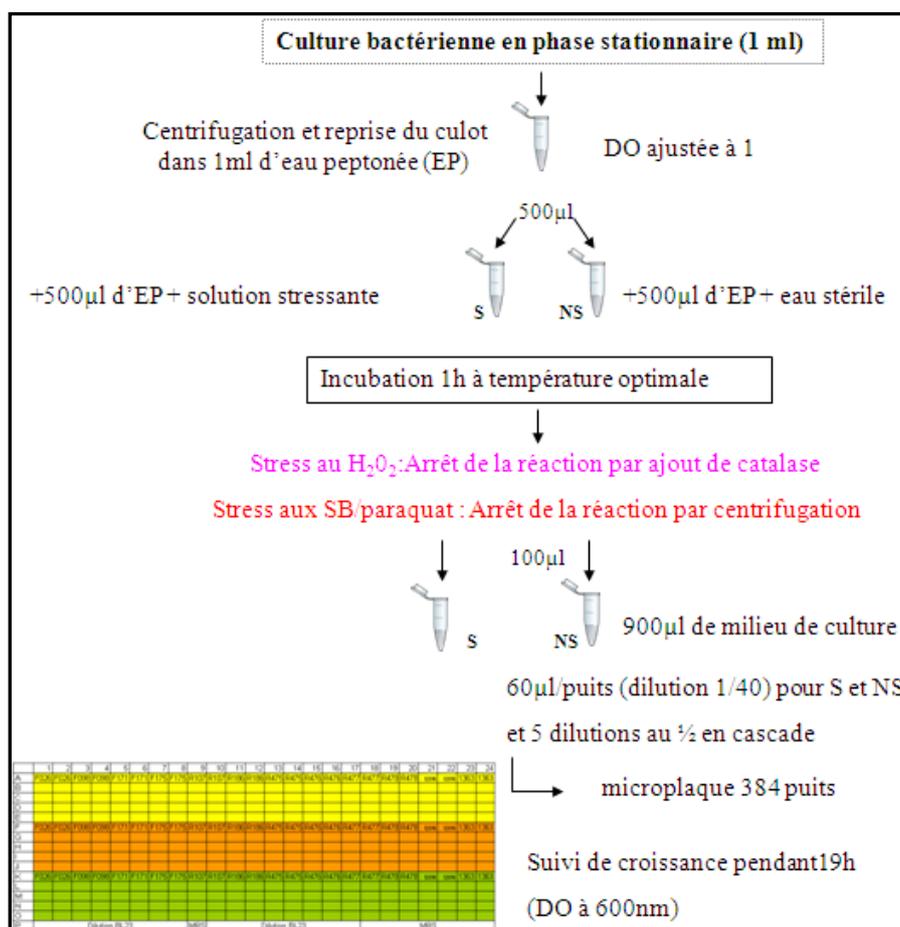


Figure 21 : Protocole mis en place pour l'étude des résistances aux stress des souches de la collection

Après lecture de la DO à 600 nm pendant 19h, nous fixons une DO cible en milieu de phase exponentielle et nous calculons le temps que met chaque dilution à atteindre cette DO cible. Nous déterminons ensuite le retard d'entrée en phase d'exponentielle de la modalité stressée par rapport à la modalité non stressée pour chaque dilution (Figure 22) et ensuite nous calculons la moyenne de ces temps.

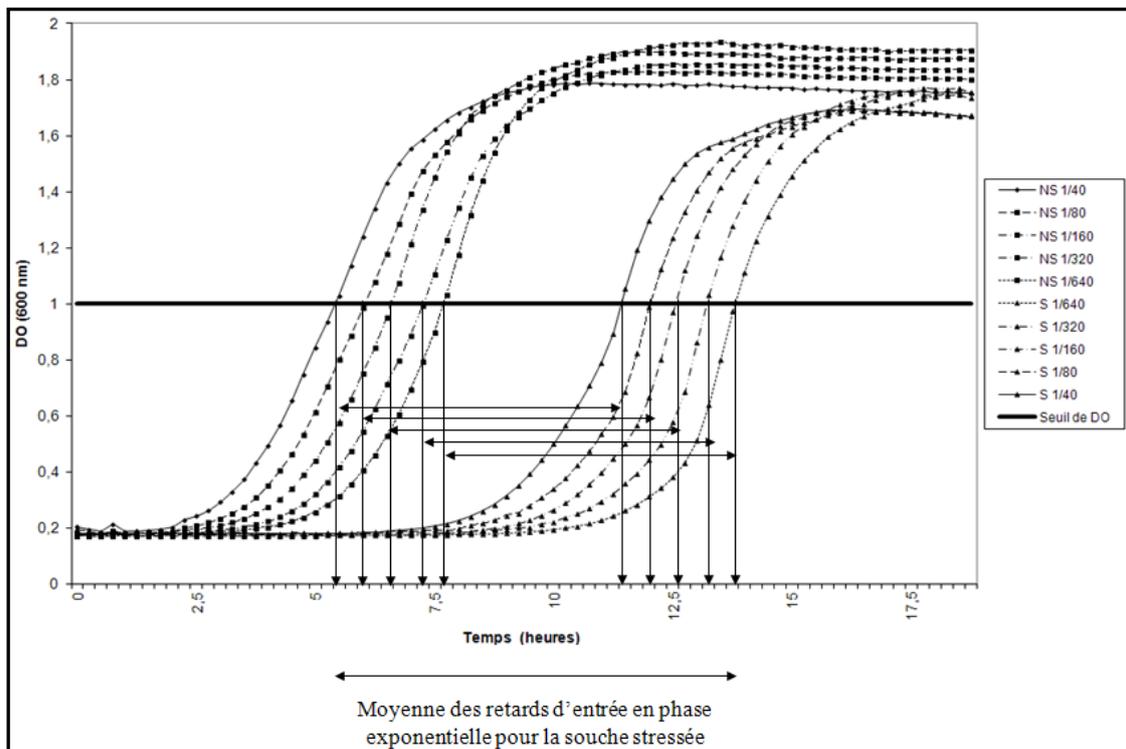


Figure 22 : Méthode de calcul du retard d'entrée en phase exponentielle pour les bactéries stressées

Les souches de la collection sont ensuite comparées entre elle pour ce critère, qui est calculé pour chaque stress testé. Les souches qui montrent les retards d'entrée en phase exponentielle les plus faibles seront considérées comme les plus résistantes au stress, puisque le stress n'affecte pas ou peu la croissance de la bactérie.

IV. Modèle *in vivo* d'étude des propriétés immuno-modulatrices de BL dans le cadre d'une infection grippale

Dans le cadre de l'étude des propriétés immuno-modulatrices des souches bactériennes sélectionnées suite aux criblages *in vitro*, dans le cas d'infections hivernales ; nous avons collaboré avec l'unité de recherche en Virologie et Immunologie Moléculaire (VIM) du centre INRA de Jouy en Josas : pour la fourniture d'un isolat particulier de virus de la grippe, le H1N1/PR8/34 (virus grippal adapté au modèle murin) et réaliser des dosages de charge virale.

1. Inoculation virale chez la souris

Des souris BALB/c femelles (Janvier, France) ont été utilisées pour cet essai. Elles ont été réparties en lots de 8 souris (4 souris/cage). Les expérimentations ont commencé après deux semaines d'acclimatation des souris au sein de l'Unité d'Expérimentation Animale Rongeurs (UEAR, INRA, Jouy-en-Josas, France) dans une cellule à atmosphère confinée, du fait de l'utilisation du virus de la grippe. Pendant toute la durée de l'expérience, les souris avaient un accès illimité à la nourriture et à l'eau. Le protocole *in vivo* que nous avons mis au point chez la souris est présenté dans la Figure 23.

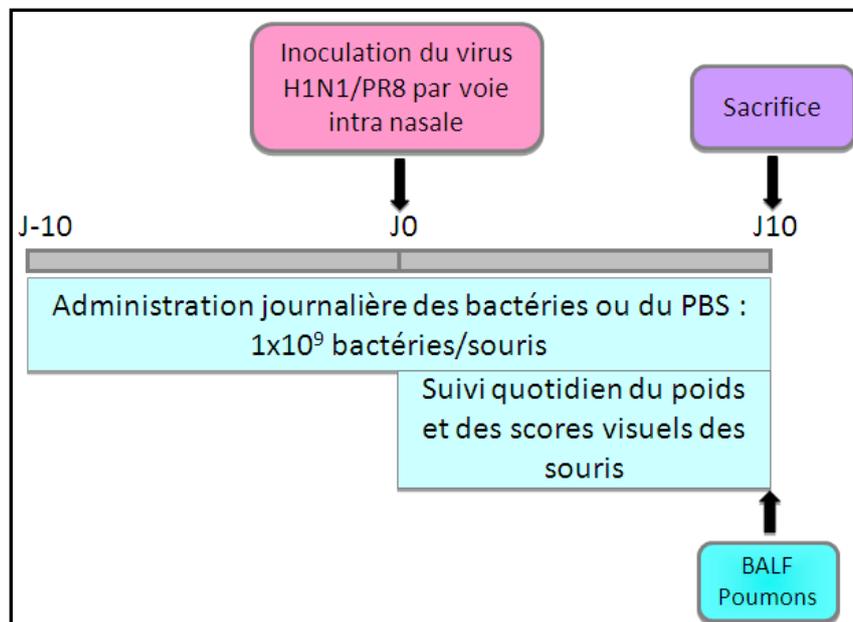


Figure 23 : Protocole *in vivo* de l'infection virale par le virus de la grippe

Le virus de la grippe H1N1/PR8 a été produit par une culture pendant 2 jours à 35°C dans des œufs (âgés de 11 jours) de poules fertiles. Le titre viral a été quantifié par un essai

sur plaque utilisant les cellules Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) et le stock viral est gardé à -80°C pour les utilisations ultérieures.

Pour les infections intra-nasales avec le virus, les souris (âgées de 7 semaines) sont d'abord anesthésiées par une injection intra-péritonéale de Imalgene 1000/kétamine (Merial, France) et Rompun/xylazine (Alcyon, France) (0,1% kétamine + 0,06 % xylazine, qsp eau physiologique). Elles sont ensuite infectées par le dépôt de 25 µl de suspension virale dans chaque narine. Plusieurs concentrations d'inoculum viraux ont été testées : 2000, 200, 100 PFU afin d'identifier la concentration n'induisant pas de mortalité, en dehors des symptômes visibles de la maladie.

2. Préparation des bactéries

Des cultures en phase stationnaire des souches candidates de bactéries probiotiques ont été centrifugées à 3000g pendant 10 minutes puis les culots sont lavés dans du PBS stérile. Le culot est resuspendu ensuite dans le PBS pour avoir une concentration finale de 1×10^9 UFC/souris. Les souris reçoivent quotidiennement 200 µl de cette dose bactérienne par des administrations orales (gavages intra-gastriques) ou simplement du PBS pour les lots témoins 10 jours en préventif et 9 jours en curatif après l'infection virale. Les souris sont sacrifiées à J10.

3. Evaluation des scores visuels

Au cours de cet essai, nous avons utilisé des marqueurs macroscopiques, qui nous renseignent sur l'état physique des souris tout au long de l'essai. D'abord, le poids des souris est suivi tous les jours à partir de l'infection virale. Nous avons aussi utilisé une échelle de notation de l'état des souris prenant en compte leur aspect extérieur : 5. Saine (aucun symptôme clinique), 4. Légère (fourrure légèrement hérissée), 3. Modérée (fourrure modérément hérissée et léthargique), 2. Sévère (fourrure sévèrement hérissée et maigre) et 1. Très sévère (pas de réaction à la stimulation) (Kawase, He et al. 2009). Pour l'évaluation de ces scores en aveugle, nous avons fait appel à des binômes de notateurs extérieurs à l'essai.

4. Lavages broncho-alvéolaires

Le jour de l'abattage, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Des lavages broncho-alvéolaires (BALF, broncho-alveolar lavage fluid) sont collectés à l'aide d'un cône attaché à une seringue, inséré dans la partie supérieure de la trachée de la souris. Des allers-retours sont alors pratiqués avec un volume total de 1 ml de PBS afin de laver les

poumons. Les BALF sont congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Des dosages d'Ac (IgA totaux, IgM totaux, IgE totaux, IgG1 spécifique au virus, IgG2a spécifique au virus et IgA spécifique au virus) sont réalisés. Les dosages des Ac totaux (IgA, IgM et IgE) ont été effectués à l'aide de kits ELISA (Mabtech, Sweden). Les dosages des Ac spécifiques au virus ont été faits avec un protocole ELISA adapté, comprenant notamment une étape de coating des plaques avec des protéines virales et l'utilisation d'Ac anti-IgG1, IgG2a ou IgA (BD-Pharmingen, France) conjugués à une peroxydase.

5. Dosage de la charge virale

Les poumons sont ensuite prélevés et congelés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C. Un morceau de quelques milligrammes de poumons est broyé en présence de tampon de lyse (RLT+ β mercaptoéthanol) et de billes en céramique de diamètre 1 mm (dans le laboratoire P2 de la VIM). L'extraction de l'ARN total à partir des poumons des souris est ensuite effectuée avec le Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, France). Les ARN sont ensuite traités avec la DNase I et la concentration en ARN total est dosée avec un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Une reverse transcriptase est réalisée avec la superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, USA) et l'amorce M1: 5'-TCT AAC CGA GGT CGA AAC GTA-3' à partir de 2,5 μ g d'ARN total selon les indications du fournisseur. Une Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitative est finalement réalisée avec le mix PCR Quanti Tect SYBR Green PCR Kit (Applied Biosystems, USA), les amorces spécifique du virus H1N1 PR8/34: M1 (sens: 5'-AAG ACC AAT CCT GTC ACC TCT GA-3'; anti-sens: 5'-CAA AGC GTC TAC GCT GCA GTC C-3') et l'appareil Mastercycler realplex (Eppendorf, France) (Le Goffic, Bouguyon et al. 2010). Les conditions d'amplification sont les suivantes : 10 minutes à 95°C, 40 cycles (15secondes à 95°C, 20 secondes à 64°C et 30 secondes à 72°C), 15 secondes à 95°C, 15 secondes à 60°C, 20 minutes de melting curve et 15 secondes à 95°C. La quantification est réalisée par comparaison à une gamme étalon virale établie à partir d'un plasmide contenant la séquence du gène cible (capside) des amorces utilisées.

6. Analyses statistiques

Les comparaisons entre les différents résultats obtenus ont été analysées par le logiciel GraphPad Prism5 ®. Les différences sont considérées comme significatives si P est < 0,05.

V. Modèle *in vivo* d'étude des propriétés anti-inflammatoires de BL dans le cadre d'une inflammation intestinale induite au DSS

Le protocole d'inflammation intestinale par le DSS a été mis en place au Japon dans les années 1990. Les concentrations de DSS à utiliser varient en fonction du type de colite souhaitée, de 1% (colite légère) à 5% (colite sévère) (Okayasu, Hatakeyama et al. 1990).

Depuis quelques années, ce protocole est régulièrement utilisé au sein de notre équipe pour la mise en évidence des effets anti-inflammatoires de souches bactériennes (Rochat, Bermudez-Humaran et al. 2007; Watterlot, Rochat et al. 2010). L'ajout de DSS dans l'eau de boisson des souris pendant 7 jours reproduit les symptômes d'une colite, provoquant chez la souris un amaigrissement accompagné de diarrhées sanglantes ou non, selon la concentration de DSS utilisée. Des souris BALB/c mâles sont régulièrement utilisées pour ce genre d'essais.

1. Inflammation intestinale chez les souris

Le protocole que nous avons utilisé est montré dans la Figure 24. Nous avons réalisé deux essais, l'un utilisant 3% de DSS (36kDa-50kDa, MP Biomedicals, France) et des souris mâles BALB/c (Janvier, France), et l'autre avec 2,5% de DSS et des souris mâles C57BL/6 (Janvier, France). Ces souris sont connues pour mieux supporter la colite induite au DSS que les souris BALB/c. Les souris sont toujours réparties en lots de 8 souris (4 souris/cage). Les expérimentations ont commencé après une semaine d'acclimatation des souris au sein de l'Unité d'Expérimentation Animale Rongeurs (UEAR, INRA, Jouy-en-Josas, France). Pendant toute la durée de l'expérience, les souris avaient un accès illimité à la nourriture et à l'eau de boisson.

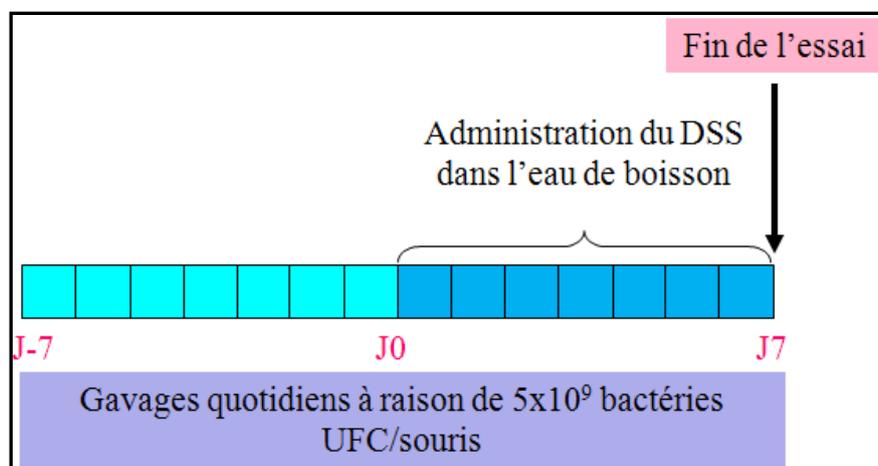


Figure 24 : Protocole de la colite murine induite au DSS

La solution de DSS est préparée et renouvelée tous les deux jours à partir de J0 dans l'eau de boisson des souris. Les consommations en eau et en aliment des souris sont relevées (pesées) quotidiennement pour contrôler l'alimentation des souris.

2. Préparation des bactéries

Des cultures en phase stationnaire des souches candidates de bactéries probiotiques ont été centrifugées à 3000g pendant 10 minutes puis les culots sont lavés dans du PBS stérile. Le culot est resuspendu ensuite dans le PBS pour avoir une concentration finale de 5×10^9 UFC/souris. Les souris reçoivent quotidiennement et par voie orale 200 μ l de cette dose bactérienne ou simplement du PBS pour les lots témoins 7 jours en préventif et 6 jours en curatif après l'induction de l'inflammation. Les souris sont sacrifiées à J7.

3. Suivi des paramètres de l'inflammation intestinale

Les animaux sont surveillés tous les jours à partir de l'ajout du DSS dans l'eau de boisson pour calculer le DAI, qui représente la moyenne des scores suivants :

- L'aspect des selles (consistance) individuellement (0 : consistance normale, 2 : fèces formées mais molles collantes et 4 : non formées, diarrhée liquide),
- La présence de sang dans les selles sera aussi recherchée ; visuellement ou par test HémocultII (SKD, France) systématiquement dès J0 et jusqu'à l'abattage (0 : absence de sang, 2 : présence de sang (détecté par Hémocult seulement) et 4 : présence de sang visible au rectum),
- Les pertes de poids par rapport au poids à J0: <1% score 0, 1-5% score 1, 5-10% score 2, 10-15% score 3 et >15% score 4.

Le jour de l'abattage des souris, un prélèvement de sang est pratiqué. Le sérum récupéré est rapidement congelé à -80°C et permettra d'identifier la présence de cytokines. Les souris sont ensuite euthanasiées par dislocation cervicale. La longueur du côlon (non ouvert) est mesurée. Ensuite, le contenu colique est récupéré par lavage avec 1 ml de PBS additionné d'un mélange d'anti-protéases (complete EDTA free inhibitor protease cocktail, Roche-Applied Biosystems, France). Il est ensuite congelé à -80°C .

Une observation visuelle permettra de déterminer un score macroscopique prenant en compte i) la présence de sang (0 : non, 1 : moyen, 2 : fort), ii) l'état de la muqueuse et plus précisément recherche d'ulcérations (0 : normale, 1 : épaissie, rougeurs, 2 : présence de sang et 3 : présence de sites d'ulcération), et iii) l'épaississement de la muqueuse (0 : aucun, 1 :

modéré et 2 : sévère). Ensuite, un échantillon d'un cm de côlon est prélevé et enroulé autour d'un cure-dent (swiss roll), la face interne de la muqueuse tournée vers l'extérieur du rouleau, puis mis rapidement dans du formol. Les échantillons sont ensuite envoyés à un laboratoire externe qui s'occupe de l'inclusion dans la paraffine et la découpe des blocs.

Les lames histologiques sont ensuite évaluées par un gastro-entérologue qui détermine en aveugle un score histologique qui prend en compte la sévérité et l'ampleur de l'inflammation, ainsi que le degré de dommages au niveau des cryptes. Un autre morceau de côlon est collecté pour le dosage des cytokines et la mesure de l'activité myéloperoxydase (MPO).

4. Dosage des cytokines

Les cytokines suivantes : IL-10 (Mabtech, Sweden), IL-12p70 (Mabtech, Sweden), TNF- α (Biolegend, USA) et IFN- γ (Mabtech, Sweden) sont dosées dans le sérum, le contenu colique et sur un morceau de côlon broyé, selon les recommandations des fournisseurs.

5. Analyses statistiques

Les comparaisons entre les différents résultats obtenus ont été analysées par le logiciel GraphPad Prism5 ®. Les différences sont considérées comme significatives si P est < 0,05.

VI. Modèle *in vivo* d'étude des propriétés anti-oxydantes de BL

Les souches identifiées grâce à leurs propriétés anti-oxydantes *in vitro* ont été testées chez des souris BALB/c femelles en les soumettant à un régime carencé à la fois en sélénium et en vitamine E. Ce régime spécial est capable d'induire un stress oxydant modéré chez la souris (Mazur, Nassir et al. 1996). La souche *L. fermentum* Me-3 a été utilisée comme témoin positif puisque ses effets anti-oxydants ont déjà été démontrées (Mikelsaar and Zilmer 2009).

1. Stress oxydant chez les souris

Les aliments carencés ou non ont été produits par l'Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux (UPAE, INRA Jouy en Josas, France) sous forme de farine. La transformation de la farine en granulés a été réalisée par SAFE (Augy, France). La composition détaillée de ce régime est présenté en annexe 2.

Le protocole expérimental de cet essai est présenté dans la Figure 25. Pendant toute la durée de l'expérience, les souris avaient un accès illimité à la nourriture et à l'eau de boisson.

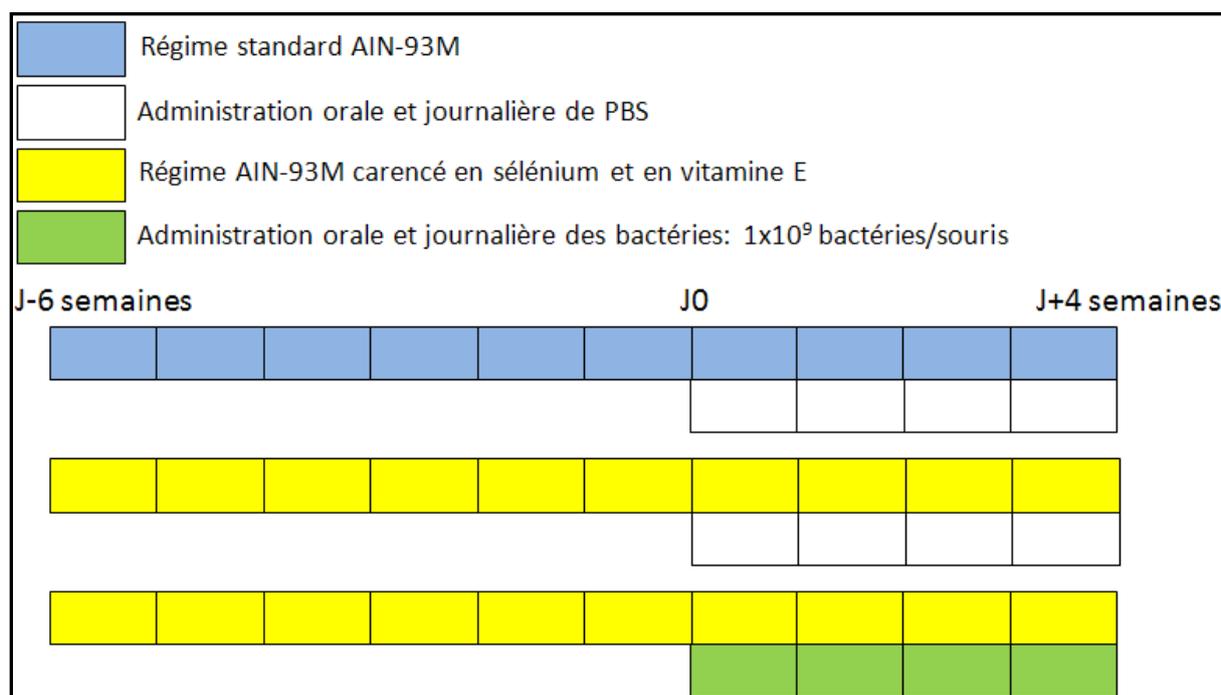


Figure 25 : Protocole de l'étude des propriétés anti-oxydantes des bactéries chez la souris

Comme le montre la Figure 25, trois lots de souris sont utilisées i) des souris recevant l'aliment non carencé et des administrations orales de PBS, ii) des souris recevant l'aliment

carencé seul et des administrations orales de PBS et iii) des souris recevant l'aliment carencé et des administrations orales avec les souches bactériennes.

2. Préparation des bactéries

Des cultures en phase stationnaire des souches candidates de bactéries probiotiques ont été centrifugées à 3000g pendant 10 minutes puis les culots sont lavés dans du PBS stérile. Le culot est resuspendu ensuite dans le PBS pour avoir une concentration finale de 1×10^9 UFC/souris. Les souris reçoivent quotidiennement des administrations orales de 200 µl de cette suspension bactérienne ou simplement du PBS pour les lots témoins pendant 4 semaines après la mise en place du stress oxydant. Les souris sont sacrifiées à la fin des 4 semaines d'administrations orales des bactéries.

3. Paramètres de suivi des effets des bactéries

Afin de cibler les marqueurs de l'oxydation à étudier, nous avons fait appel à Laraspiral, un laboratoire expert du domaine de l'oxydation, et détenteur d'un test breveté. Les marqueurs de l'oxydation choisis, devraient être pertinents dans le cadre d'un stress oxydant et être suffisamment sensibles pour pouvoir distinguer l'effet des bactéries potentiellement anti-oxydantes. D'autre part ces marqueurs devraient dans l'idéal répondre aux exigences de l'EFSA puisque la finalité du projet est la commercialisation d'un produit fermenté aux propriétés probiotiques anti-oxydantes.

Six semaines après le début de l'essai, et avant le début de l'administration des bactéries, nous prélevons du sang aux souris alimentées par le régime carencé ou non, pour vérifier que la carence en sélénium et vitamine E est installée.

A la fin de l'essai, un prélèvement de sang est pratiqué. Les souris sont ensuite euthanasiées par dislocation cervicale. Nous récupérons alors les foies que nous congelons dans l'azote liquide, puis ils sont stockés à -80°C jusqu'à leur analyse.

Le choix s'est finalement porté sur l'étude de l'oxydation au niveau du sang et des foies des souris, en utilisant le test KRL breveté par Laraspiral (Prost 1992). Le principe de ce test (Figure 26) consiste à soumettre un échantillon de sang à une attaque radicalaire et de suivre ensuite le temps nécessaire à la lyse de 50% des cellules sanguines. Plus l'échantillon est riche en composés anti-oxydants, plus le sang sera résistant à l'attaque radicalaire et

inversement. Les résultats seront exprimés en équivalent trolox/L de sang, le trolox étant un analogue hydrosoluble de la vitamine E.

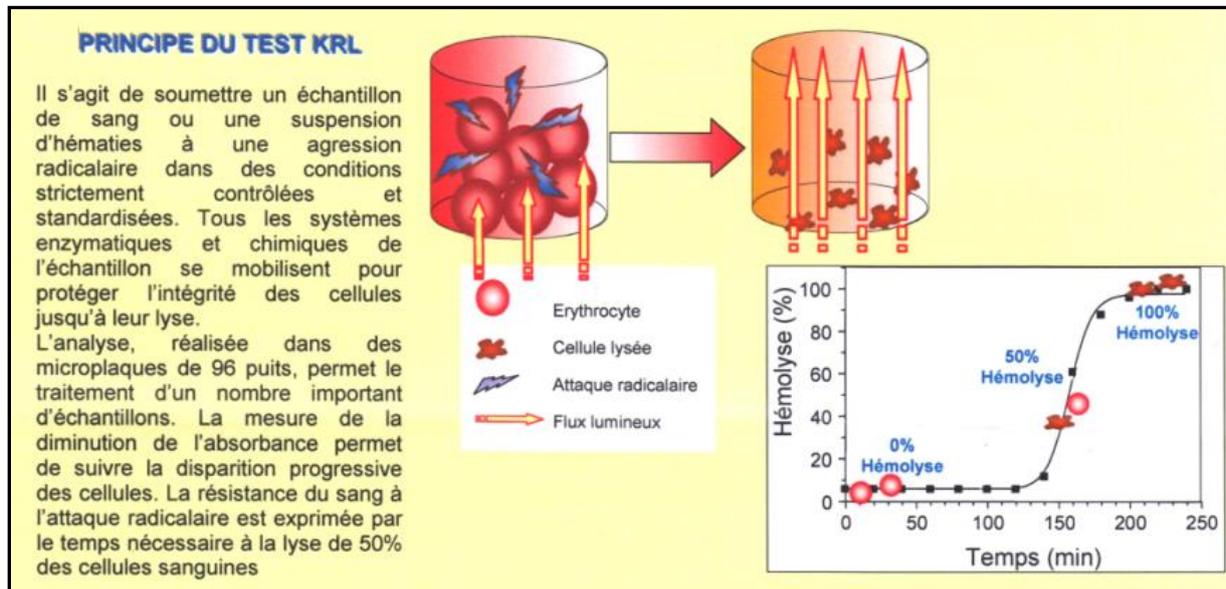


Figure 26 : Principe du test KRL

D'autre part, les malondialdéhydes (MDA) qui reflètent la peroxydation des lipides sont quantifiées dans le foie. Enfin, le glutathion (anti-oxydant cellulaire non enzymatique majeur de l'organisme) est dosé dans le foie (lieu de stockage principal du glutathion), sous ses deux formes : la forme réduite ou active GSH et la forme oxydée ou utilisée et inactive GSSG. Le ratio GSSG/GSH est aussi un bon indicatif de l'oxydation.

4. Analyses statistiques

Les comparaisons entre les différents résultats obtenus ont été analysées par le logiciel GraphPad Prism5 ®. Les différences sont considérées comme significatives si P est < 0,05.

VII. Caractérisations biochimiques et génétiques des souches sélectionnées

Les souches sélectionnées suite aux différents essais *in vivo* sont caractérisées i) visuellement au microscope, ii) biochimiquement par des galeries API (Biomérieux, France) qui permettent d'établir des profils métaboliques et, dans certains cas, d'identifier l'espèce d'une bactérie et iii) génétiquement avec les séquences de l'ADN 16S. Ces caractérisations viendront étayer en complément d'autres méthodes de caractérisation (séquençage du génome), le dépôt des demandes d'allégations à l'EFSA.

Les galeries API (Biomérieux, France) sont préparées à partir de colonies bactériennes isolées sur milieu gélosé. La lecture des galeries est faite sur le site api web de Biomérieux.

Pour la caractérisation génétique, à partir d'une culture bactérienne liquide, nous procédons à une extraction d'ADN suivie d'une amplification par PCR de l'ADN 16S. Après migration sur gel et purification de la bande, nous expédions le produit PCR pour séquençage (environ 1500 bases).

Afin de fragiliser la membrane de bactérie issue d'une culture liquide en phase stationnaire ; un culot de cette culture est repris dans une solution d'EDTA et de mélange enzymatique (mutanolysine, 41 µg/ml, lysostaphine 250 U/ml, lysosymes 10 mg/ml) et incubé 1 heure à 37°C. Pour achever la fragilisation de la membrane bactérienne, une lyse mécanique durant 10 minutes à 25Hz est pratiquée en présence de billes de verre au Tissue Lyser (Qiagen, France).

L'ADN génomique est ensuite extrait en utilisant le DNA Purification kit (Promega, USA). Une PCR est ensuite réalisée avec la Pfu Turbo DNA Polymerase (Agilent, USA) et les amorces S-*--Univ-1492-b-A-21 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3', position 1517R) et S-D-Bact-0008-a-S-20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', position 008F) spécifiques aux lactobacilles (Gerard, Lepercq et al. 2007), et l'appareil Mastercycler gradient (Eppendorf, France) et les conditions suivantes : 15 minutes = 95°C, 29 cycles (30 secondes à 95°C, 30 secondes à 52°C, 90 secondes à 72°C) et 10 minutes à 72°C. La purification du produit PCR est effectuée avec le kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, USA) avant envoi au séquençage (MWG, Allemagne).

RESULTATS

&

DISCUSSION

Les aliments fonctionnels et les compléments alimentaires à base de souches bactériennes probiotiques sont en plein essor depuis quelques années. C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse portant sur l'identification de nouvelles souches bactériennes aux propriétés probiotiques. En effet, un des objectifs de ma thèse a été la sélection de souches bactériennes à propriétés immuno-modulatrices et anti-oxydantes parmi une collection de souches appartenant à différentes espèces bactériennes ayant des vertus probiotiques supposées.

Pour identifier des souches immuno-modulatrices, une sélection a été faite sur la base de tests en modèles cellulaires *in vitro* (partie I). En parallèle, nous avons étudié la résistance des souches de la collection à des stress *in vitro* définis au préalable (partie II).

Les souches immuno-modulatrices sélectionnées suite au premier criblage ont été ensuite testées sur des modèles animaux i) d'infection par le virus de la grippe (partie III) et ii) d'inflammation intestinale induite chimiquement par le DSS (partie IV) afin de confirmer *in vivo* les propriétés de ces souches.

Pour identifier des souches anti-oxydantes, après l'étude de la résistance des souches à des stress *in vitro*, nous n'avons conservé que des souches potentiellement anti-oxydantes et qui résisteraient au passage dans le TD et aux stress rencontrés pendant le processus industriel en collaboration avec nos collègues du GPMA. Les souches identifiées ont été par la suite testées dans un modèle murin de stress oxydant modéré induit par une carence alimentaire en sélénium et en vitamine E (partie V).

I. Identification de souches immuno-modulatrices *in vitro*

Nous présentons dans cette section les résultats que nous avons obtenus lors de la recherche de souches immuno-modulatrices sur la base d'essais *in vitro*.

1. Contexte de l'étude

L'identification de souches bactériennes probiotiques nécessite une caractérisation de leurs propriétés *in vitro* et *in vivo*. Les résultats de ces caractérisations permettront de sélectionner des souches probiotiques candidates qui seront étudiées chez l'homme.

Seuls, les essais *in vitro* ne sont pas suffisants pour affirmer de potentiels effets bénéfiques des bactéries probiotiques. Ils permettent par contre, de comparer une centaine de souches bactériennes pour un même critère et de sélectionner les souches les plus intéressantes à tester par la suite *in vivo*, où il n'est possible de tester que peu de souches bactériennes vu l'ampleur de ce genre d'expérimentations. Les paramètres de caractérisation des souches *in vitro* étant très variés, de plus en plus de publications sont dédiées à cette première phase de criblage de souches (Dunne, O'Mahony et al. 2001; Mileti, Matteoli et al. 2009; Dong, Rowland et al. 2011; Lee, Yoon et al. 2011).

2. Résultats

Pour l'identification de souches immuno-modulatrices à partir de la collection bactérienne établie, nous avons choisi les modèles cellulaires PBMC et HT-29 qui permettent d'obtenir des résultats complémentaires sur les profils immuno-modulateurs des bactéries *in vitro*. Dans la Figure 27, nous présentons les résultats du criblage de la collection lors de la co-incubation avec les PBMC. Le classement des souches a été établi en fonction du ratio des cytokines IL-12p70/IL-10. Les ratios varient de 7,5 à 0,02 et la valeur du témoin PBS sert de référence. Plus ce rapport est élevé, plus la souche montre un profil pro-inflammatoire ; et plus il est bas, plus la souche est anti-inflammatoire. Le même raisonnement a été appliqué pour le criblage de la collection de bactéries lors de la co-incubation avec les HT-29 (Figure 28). Le classement des souches a été établi en fonction du pourcentage de variation de la cytokine IL-8 en fonction du témoin HT29-TNF- α . Lorsque ce pourcentage est supérieur à 100 %, cela reflète un profil pro-inflammatoire de la souche ; et au contraire, s'il est diminué, cela signifie que la souche inhibe la production d'IL-8 et qu'elle a un profil anti-inflammatoire.

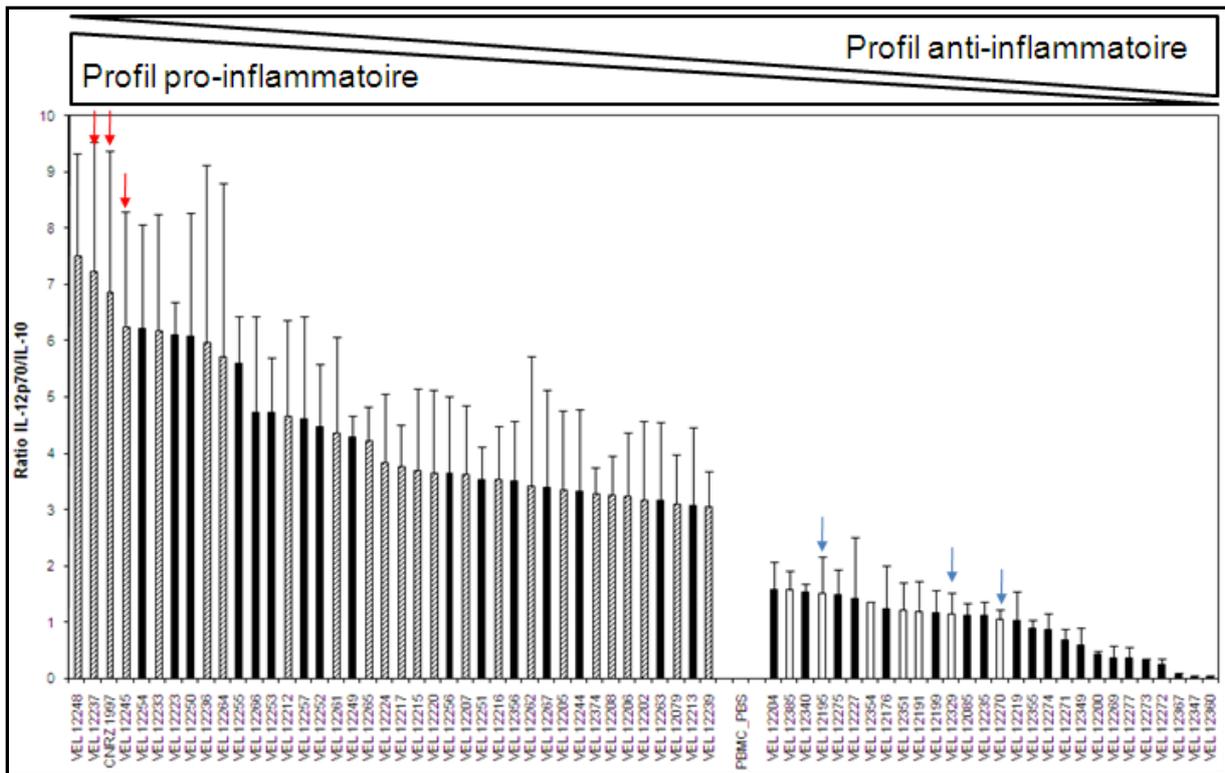


Figure 27 : Classement des souches selon le ratio IL-12p70/IL-10

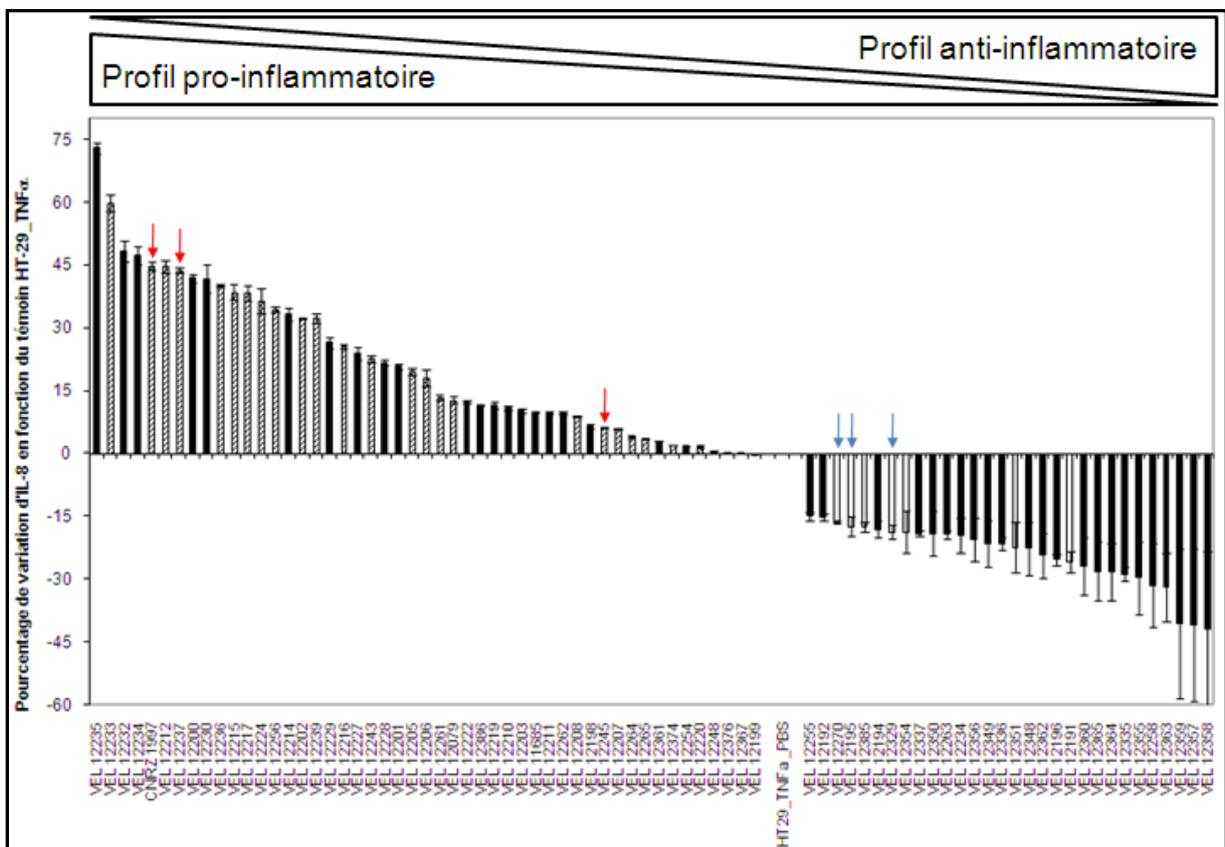


Figure 28 : Classement des souches selon le pourcentage de variation d'IL-8

Pour plus de clarté, les souches considérées comme neutres n'ont pas été reportées sur les figures. Ces souches représentent respectivement 44% et 51% de l'ensemble de la collection, après criblage avec les PBMC et les HT-29. Le seuil à partir duquel les souches ont des propriétés immuno-modulatrices est fixé au delà d'une variation de 20 % (en plus ou en moins) par rapport aux témoins.

Sur les souches ayant montré un profil pro- ou anti-inflammatoires, celles qui ont montré le même profil dans les deux modèles sont représentées sur les deux figures précédentes par i) des hachures pour les souches pro-inflammatoires et ii) des histogrammes blancs pour les souches anti-inflammatoires.

Nous avons aussi identifié quelques souches présentant des profils différents dans les deux modèles. Par exemple, les souches *L. delbrueckii* VEL 12227 et *L. salivarius* VEL 12200 montrent un profil anti-inflammatoire avec le modèle PBMC et un profil pro-inflammatoire avec le modèle HT-29.

Ce double screening *in vitro* nous a permis d'identifier 24 souches pro-inflammatoires et 7 souches anti-inflammatoires. Parmi ces souches, nous avons choisi 3 souches ayant des profils pro-inflammatoires : *L. plantarum* VEL12238 (appelée dans la suite CNRZ 1997), *L. paracasei* VEL12237 et *L. lactis* VEL12245, ainsi que 3 souches aux profils anti-inflammatoires : *L. paracasei* VEL12195, *B. longum* VEL12270 et *B. bifidum* VEL12329.

Pour valider les effets de ces souches *in vitro*, celles-ci ont été à nouveau après co-incubées avec des PBMC, mais provenant de 5 donneurs aux différents types ethniques (hispanique, caucasien, iranien, afro-américain et philippin) présentant les mêmes caractéristiques d'état sanitaire que le premier donneur (âge connu < 65 ans, indice de masse corporelle < 30, non fumeur, pas de prise d'anti-inflammatoires 15 jours avant la prise de sang, HIV, hépatites A et B négatifs, absence de champignons et de bactéries dans le sang collecté). Les ratios IL-12p70/IL-10 obtenus lors de cet essai sont présentés dans la Figure 29.

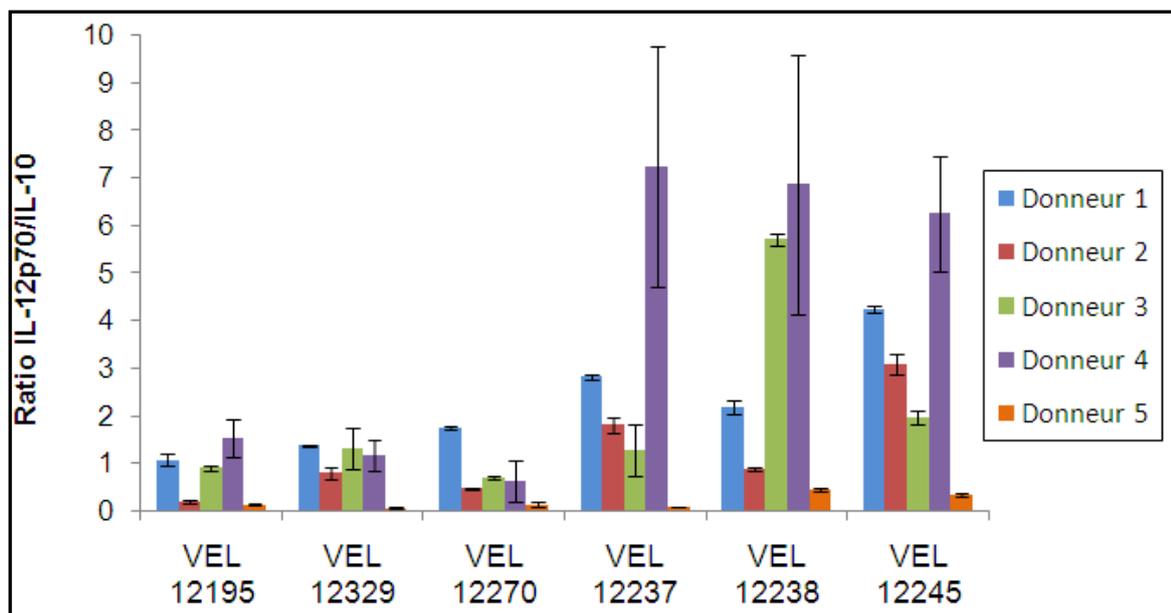


Figure 29 : Criblage des souches sélectionnées avec 5 donneurs de PBMC différents

En comparant les résultats obtenus avec chaque donneur, il est possible de retrouver les profils pro-inflammatoires déjà établis, à l'exception du donneur 5 qui ne génère que des ratios IL-12p70/IL-10 très faibles. Ce criblage, réalisé sur des PBMC issus de différents individus valide les tendances des profils immuno-modulateurs des souches testées.

3. Discussion

Les tests *in vitro* que nous avons mis en place pour étudier les propriétés immuno-modulatrices de plus d'une centaine de souches ont une valeur prédictive et nous ont permis de réduire le nombre de souches bactériennes candidates à tester chez l'animal dans différents modèles. Ce caractère prédictif des essais menés *in vitro* a été démontré pour la première fois par Foligné *et al.* en 2007. En effet, ces chercheurs ont criblé 13 bactéries pour leurs propriétés immuno-modulatrices après co-incubation avec des PBMC humaines. Leur but étant d'identifier des souches anti-inflammatoires, ils ont calculé les ratios IL-10/IL-12. Leurs résultats ont montré que les souches possédant les ratios les plus hauts, et donc les meilleures propriétés anti-inflammatoires *in vitro*, ont procuré une meilleure protection dans un modèle de colite murine. Ils ont alors corrélié les résultats prédictifs *in vitro* avec ceux obtenus *in vivo* (Foligne, Nutten *et al.* 2007).

Les modèles cellulaires utilisés, ainsi que les cytokines ciblées, dépendent de l'effet recherché de la souche bactérienne. Si dans la littérature, la majorité des criblages des propriétés menés *in vitro* ciblaient l'identification de souches anti-inflammatoires (Foligne, Nutten *et al.* 2007; Wang, Li *et al.* 2009; Grimoud, Durand *et al.* 2010; Preising, Philippe *et*

al. 2010; Kaci, Lakhdari et al. 2011; Santos Rocha, Lakhdari et al. 2011), la recherche de souches aux effets pro-inflammatoires a aussi été étudiée. Kawashima *et al.* ont ainsi criblé 203 BL à la recherche de la souche qui induit une production d'IL-12 accrue, après co-incubation des bactéries avec des macrophages murins ; les propriétés immuno-modulatrices de cette souche, ont été par la suite caractérisées dans un modèle murin d'infection virale par le virus de la grippe (Kawashima, Hayashi et al. 2011).

L'un des objectifs de ma thèse était d'identifier des souches immuno-modulatrices *in vitro* pour étudier ensuite leurs effets *in vivo* dans différents modèles murins. Cette première phase de criblage nous a permis d'identifier 24 souches pro-inflammatoires et 7 souches anti-inflammatoires *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé un double criblage avec des modèles simples et standardisés afin de classer les souches de la collection selon leurs profils immuno-modulateurs. Cette classification a été réalisée après dosage par ELISA i) des cytokines IL-10 et IL-12p70 après co-incubation des souches avec les PBMC et ii) de la cytokine IL-8 produite suite à la co-incubation des souches de la collection avec la lignée épithéliale HT-29.

Ce double criblage *in vitro* nous a permis de sélectionner 3 souches bactériennes pro-inflammatoires : *L. plantarum* VEL12238 (appelée dans la suite CNRZ 1997), *L. paracasei* VEL12237 et *L. lactis* VEL12245, qui seront testées dans un modèle murin d'infection par le virus de la grippe. Nous avons aussi sélectionné 3 souches au profil anti-inflammatoire : *L. paracasei* VEL12195, *B. longum* VEL12270 et *B. bifidum* VEL12329 qui seront testées dans un modèle d'inflammation intestinale chez la souris.

II. Etude de la résistance des souches de la collection aux stress

Nous présentons dans cette section les résultats que nous avons obtenus lors de la caractérisation des souches de la collection aux stress sur la base d'essais *in vitro*.

1. Contexte de l'étude

La recherche de nouvelles souches probiotiques compatibles avec une utilisation industrielle implique que celles-ci soient résistantes à des stress de type biologique lors du passage dans le TD (variations de pH, sécrétions biliaires, concurrence avec les bactéries du microbiote...) et technologique (décongélation, fermentation, stockage...). Ainsi, la souche idéale serait capable d'exercer un effet bénéfique pour la santé de l'hôte tout en étant capable de résister aux procédés de transformation industriels (Charteris, Kelly et al. 1998; Jacobsen, Rosenfeldt Nielsen et al. 1999; Bron, Marco et al. 2004; Grimoud, Durand et al. 2010; Koll, Mandar et al. 2010).

Dans le cadre de notre projet, nous avons caractérisé la résistance des souches de la collection à des stress oxydants (H_2O_2 et paraquat) et aux SB, sous formes de chocs.

2. Résultats

Afin d'étudier les résistances des souches de la collection à des stress biologiques, représentés par le peroxyde d'hydrogène, le paraquat et les SB, nous avons mis au point un protocole *in vitro* rapide, peu coûteux et qui permet d'étudier simultanément une trentaine de souches par jour. Ce protocole, présenté dans la partie matériels et méthodes, consiste à tester la croissance des souches dans deux conditions différentes (souche stressée et non stressée) en suivant la DO à 600 nm pendant 18 heures.

Le stress au paraquat n'a pas été discriminant vis-à-vis des souches de la collection (résultats non présentés). Nous nous intéresserons donc seulement aux stress induits par le peroxyde d'hydrogène et les SB. Le classement des souches de la collection après les stress au H_2O_2 et aux SB selon le paramètre retard d'entrée en phase exponentielle de la souche stressée (la méthode d'analyse est présentée dans la partie matériels et méthodes), par rapport à la souche non stressée est présenté dans les figures 30 et 31.

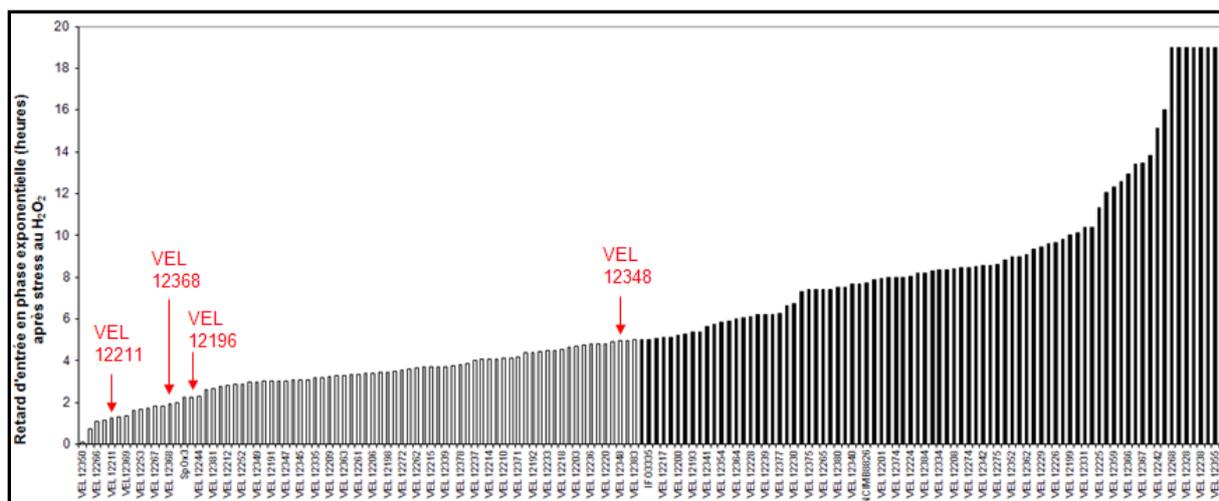


Figure 30 : Retards d'entrée en phase exponentielle pour les souches de la collection après stress au peroxyde d'hydrogène

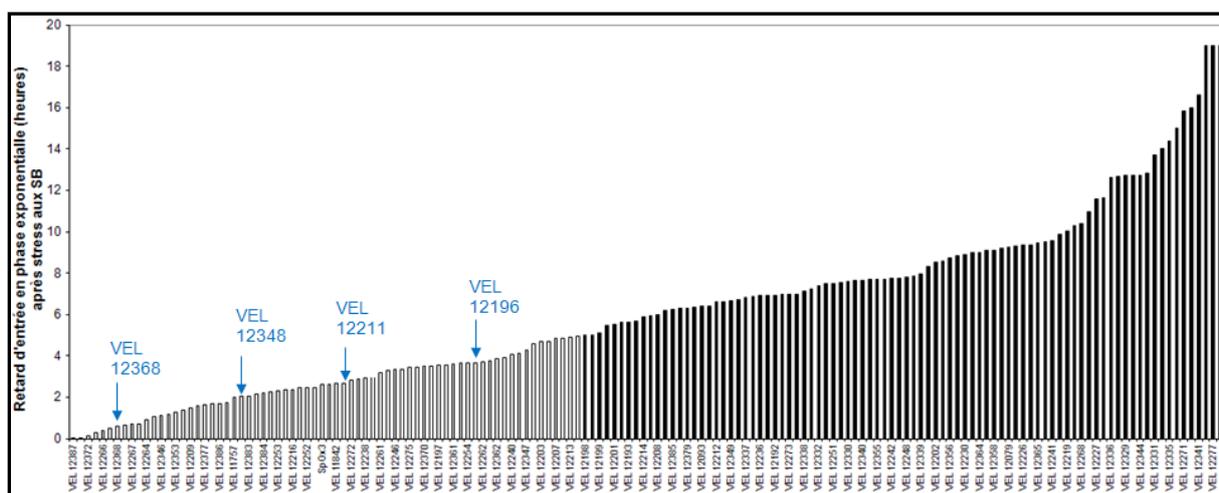


Figure 31 : Retards d'entrée en phase exponentielle pour les souches de la collection après stress aux SB

Pour juger la résistance des souches aux stress testés, nous avons fixé un retard d'entrée en phase exponentielle des souches maximal de 5 heures. Ce temps a été choisi d'une part pour diviser les distributions obtenues avec les souches en 3 groupes (résistantes, moins résistantes, non résistantes). D'autre part, le temps de digestion chez l'homme est estimé entre 3 et 6 heures, donc nous avons pris en considération un temps moyen de 5 heures, qui permettrait à une souche bactérienne de se retrouver dans le côlon et d'exercer son activité.

Les souches montrant des retards d'entrée en phase exponentielle supérieurs à 13 heures sont considérées comme non résistantes aux stress. Pour le stress au H₂O₂ (10 mM), 49 % des bactéries de la collection représentant 77 souches ont montré une bonne résistance avec

un retard d'entrée en phase exponentielle inférieur à 5 heures. De plus, 71 souches (45 % des souches de la collection) avaient une résistance intermédiaire, avec un retard d'entrée en phase exponentielle compris entre 5 et 13 heures. Et 10% des souches de la collection n'ont pas montré de résistance à H₂O₂ (Figure 30). Pour le stress aux SB, 44 % des bactéries de la collection (70 souches) ont montré une bonne résistance avec un retard d'entrée en phase exponentielle inférieur à 5 heures. Une résistance intermédiaire a été observée pour 80 souches (62,5 % de la collection) avec un retard d'entrée en phase exponentielle compris entre 5 et 13 heures. Seulement 7 souches n'ont pas montré de résistance aux SB (Figure 31).

Nous avons croisé ces résultats pour identifier des souches résistantes à la fois au H₂O₂ et aux SB. Et nous avons compté 40 souches (25 % des bactéries de la collection) montrant une résistance aux deux stress testés. Sur ces 40 souches, seulement 4 souches ont été retenues pour la suite des essais. Les souches VEL 12368 (*S. thermophilus*), VEL12211 (*L. zaeae*) et VEL 12196 (*L. plantarum*), qui montrent de très bonnes résistances à H₂O₂ et la souche VEL12348 (*L. brevis*) qui montre une plus faible résistance à H₂O₂. Toutes ces souches sont résistantes au H₂O₂ et aux SB avec un retard d'entrée en phase exponentielle inférieur à 5 heures. Nous supposons que les souches résistantes à un stress oxydant pourraient avoir des propriétés anti-oxydantes. Les souches sélectionnées potentiellement anti-oxydantes puisqu'elles résistent à H₂O₂ (10 mM) et qui devraient résister au passage dans le TD grâce à leurs résistances aux SB, ont ainsi été caractérisées plus finement par nos collègues du GPMA. Ils ont ainsi étudié les viabilités de ces souches après des stress de pH physiologiques (jus gastrique à base de pepsine à pH 2 et jus gastrique à base de pancréatine à pH 8), et après congélation/décongélation (conditions de stockage). Ils ont aussi mesuré la production de SOD et de catalase par ces souches. Seules les souches VEL12348 (*L. brevis*) et VEL12211 (*L. zaeae*) ont montré de bons résultats (production de SOD, résistances après stress induit par des pH 2, pH 8 et après congélation/décongélation) et ont donc été sélectionnées pour l'essai *in vivo* consistant à induire un stress oxydant modéré chez de jeunes souris en les soumettant à une alimentation carencée en sélénium et en vitamine E.

La souche immuno-modulatrice *L. plantarum* CNRZ 1997 a un retard d'entrée en phase exponentielle suite à un stress aux SB *in vitro* inférieur à 3 heures. Cette souche devrait donc supporter facilement le passage à travers le TD des souris lors de l'essai *in vivo*. En revanche, les souches immuno-modulatrices *L. paracasei* VEL12195, *L. paracasei* VEL12237, *L. lactis* VEL12245, *B. longum* VEL12270 et *B. bifidum* VEL12329 ont un retard d'entrée en phase exponentielle suite à un stress aux SB *in vitro* respectifs de 6,2 ; 7,2 ; 6,3 ; 5,6 et 12,7 heures, et possèdent donc une résistance intermédiaire.

3. Discussion

Les conditions *in vitro* auxquelles les bactéries ont été exposées sont différentes des vraies conditions de stress dans le TD chez la souris ou chez l'homme. En effet, dans le TD, la matrice alimentaire peut protéger la bactérie des effets des sécrétions intestinales et gastriques. Ce n'est pas pour autant que les essais *in vitro* ne sont pas importants. De tels essais peuvent au contraire permettre de comparer différentes souches bactériennes dans des conditions identiques. Ces tests représentent aussi l'une des premières phases de criblage, afin de réduire le nombre de souches étudiées.

Dans le cadre de notre étude, nous avons analysé la résistance des souches de notre collection bactérienne à des stress biologiques *in vitro*, induits par le peroxyde d'hydrogène et les SB. Le protocole que nous avons mis au point est rapide, peu coûteux et permet d'étudier simultanément une trentaine de souches par jour. Dans notre cas, nous avons basé l'identification de souches anti-oxydantes et résistantes aux SB sur le calcul du retard d'entrée en phase exponentielle de la souche stressée.

En utilisant cette méthode, nous avons confirmé les résistances au peroxyde d'hydrogène des souches *L. casei* BL23 MnKat+ (produisant une CAT manganèse-dépendante MnKat) et *L. lactis lactis* SpOx (Rochat, Gratadoux et al. 2005; Rochat, Bermudez-Humaran et al. 2007). Ces souches ont montré des retards d'entrée en phase exponentielle respectifs de 1,72 et 2,24 heures.

A l'issue de ces essais *in vitro*, nous avons ensuite sélectionné 3 souches très résistantes au H₂O₂ (10 mM) avec un retard d'entrée en phase exponentielle de 2 heures : VEL 12368 (*S. thermophilus*), VEL12211 (*L. zaeae*) et VEL12196 (*L. plantarum*) et une souche modérément résistante, présentant un retard d'entrée en phase exponentielle aux alentours de 5 heures : VEL12348 (*L. brevis*). Ces souches ont été testées par nos collègues du GPMA pour d'autres paramètres *in vitro* (production de SOD et de catalase, résistance à pH2, pH8 et congélation/décongélation). A l'issue de ces analyses, seules les souches *L. zaeae* VEL12211 et *L. brevis* VEL12348 ont été sélectionnées pour l'essai *in vivo* consistant à induire un stress oxydant modéré chez de jeunes souris en les soumettant à une alimentation carencée en sélénium et en vitamine E.

III. Identification d'une souche « anti- grippale »

Nous présentons dans cette section les résultats que nous avons obtenus lors de la recherche de souches immuno-modulatrices permettant d'atténuer les symptômes grippaux *in vivo*.

1. Contexte de l'étude

L'utilisation de BL pour aider à lutter contre les infections hivernales est prometteuse, puisque de nombreuses études montrent que ces bactéries peuvent avoir un effet positif contre ces infections. Cependant, il n'existe pas de paramètre unique pour affirmer qu'une souche aura des effets certains chez l'animal ou chez l'homme. Ainsi, dans le cadre de ma thèse, nous avons développé un modèle murin grippal pour tester les pouvoirs immuno-modulateurs des souches pro-inflammatoires sélectionnées suite au criblage *in vitro*. Ce modèle grippal est testé chez des souris BALB/c femelles qui reçoivent les souches avant et après l'infection par le virus H1N1 PR8/34.

2. Résultats

Le choix de la dose virale à inoculer aux souris a été établi suite aux discussions avec nos collègues de la VIM. Ceux-ci utilisent un modèle d'infection grippale pour tester l'efficacité de vaccins et se basent sur l'inoculation de doses virales massives induisant fréquemment la mort des souris. Nous avons alors décidé de diminuer la dose des inoculums viraux afin d'induire une infection modérée chez les souris.

Nous avons commencé les essais chez la souris en testant les 3 souches au profil pro-inflammatoire, sélectionnées après le double screening *in vitro* (seule la meilleure souche sera présentée sur les figures). Lors de ces essais, nous avons aussi testé deux souches témoins bien étudiées et bien connues pour leurs effets protecteurs dans différents modèles de grippe : *L. rhamnosus* LGG (Kawase, He et al. 2009; Kawase, He et al. 2011) et *L. casei* DN 114-001 (Giovannini, Agostoni et al. 2007; Boge, Remigy et al. 2009; Guillemard, Tondu et al. 2010). Face aux pertes de poids dépassant les 20% pour les souris témoin (Figure 32), avec la dose virale de 2000 Plaque Forming Unit (PFU), nous avons dû arrêter l'essai et sacrifier les souris à J7. A cette dose virale, nous avons observé une tendance de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 à améliorer l'état des souris après l'infection par le virus de la grippe.

Sur les figures 32 et 33, nous présentons les pertes de poids des souris infectées ou non avec le virus, et recevant du PBS par administration orale. Nous présentons aussi les courbes de poids obtenues après administration quotidienne avant et après l'infection virale avec le virus H1N1 PR8/34, des souches témoins *L. rhamnosus* LGG ou *L. casei* DN 114001, et de la souche probiotique candidate CNRZ 1997.

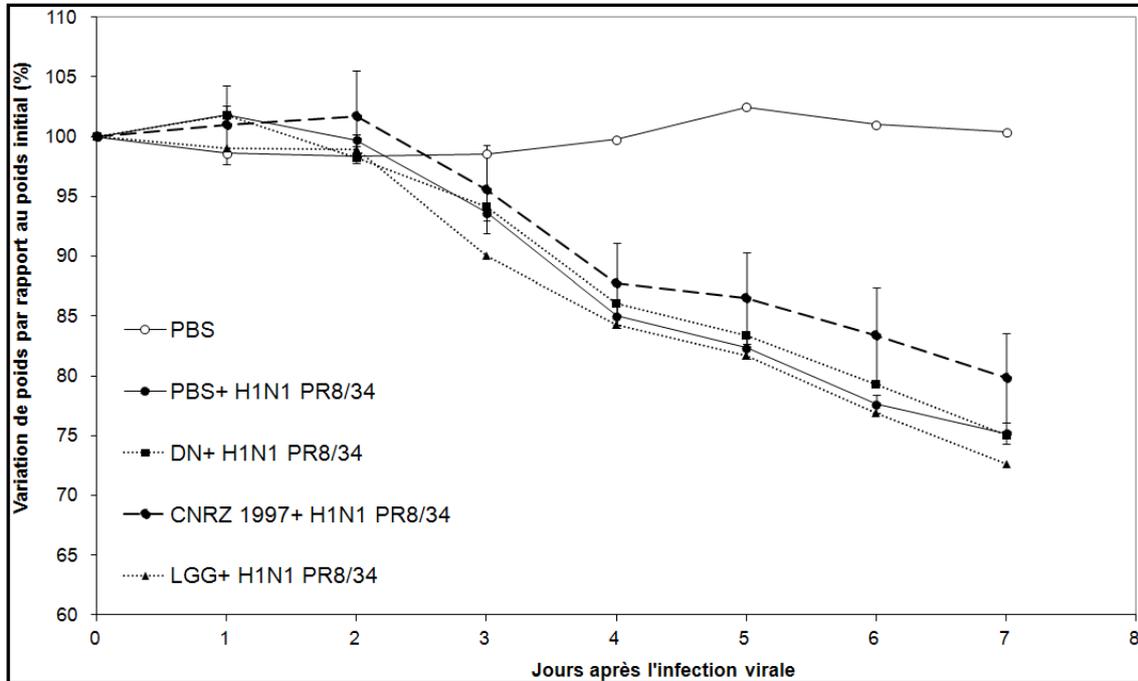


Figure 32 : Variation des poids des souris après infection virale à 2000 PFU

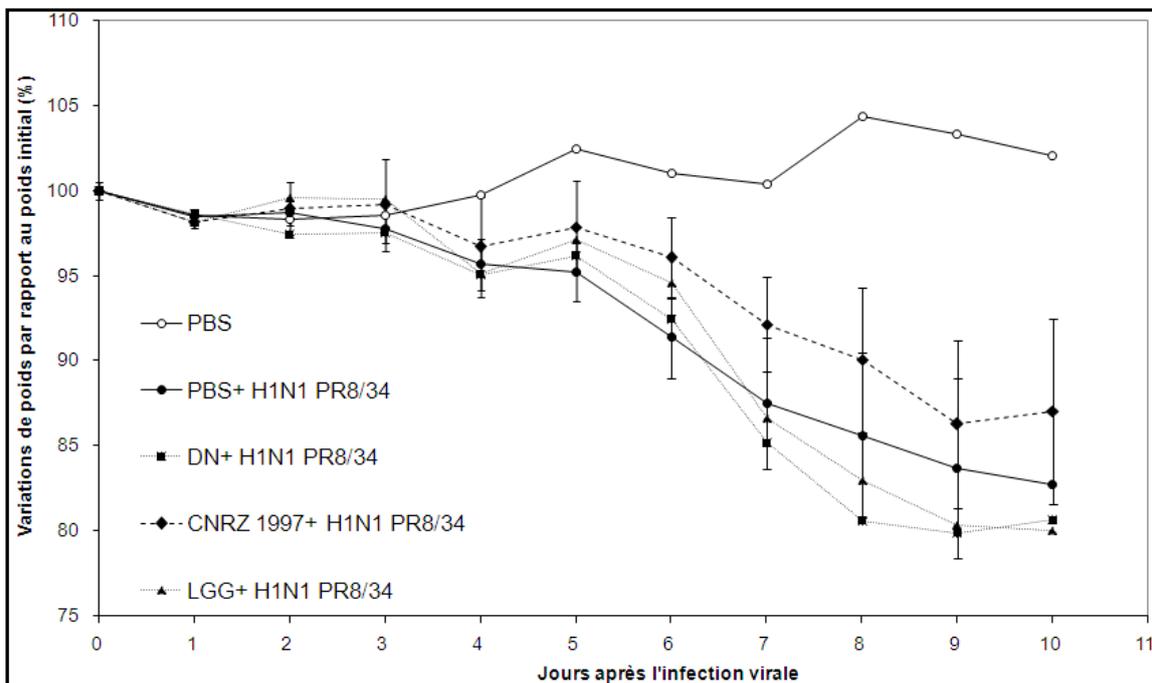


Figure 33 : Variation des poids des souris après infection virale à 200 PFU

Lorsque nous avons testé la dose de 200 PFU (Figure 33), les souris perdaient moins de poids en comparaison avec l'essai à 2000 PFU, mais les variations de poids des souris restaient importantes.

Concernant l'effet des souches, les courbes de poids obtenues avec les souches VEL12237 et VEL12245 étaient presque confondues avec celle du témoin et n'ont pas été reportées sur les figures. En revanche, la souche CNRZ 1997, avec les deux doses virales testées, offre une meilleure protection contre les effets de l'infection virale que les deux autres souches témoins. En effet, dans les derniers jours de l'essai, les courbes de poids des souris traitées avec la souche CNRZ 1997, sont supérieures à celles obtenues avec les souris témoins infectées par le virus (Figure 32). A la dose 200 PFU, la souche CNRZ 1997 semble limiter les effets de l'infection mais de manière non significative.

Ces premiers résultats nous ont incités à tester des doses virales plus faibles afin de mieux analyser l'effet de la souche CNRZ 1997. En effet, le but du projet n'est pas la commercialisation d'un médicament contre la grippe, mais d'un produit probiotique qui sera utilisé en prévention contre les infections respiratoires hivernales chez l'homme. Nous avons alors testé des doses plus modérées (100 et 20 PFU) avec cette souche identifiée grâce aux précédents essais *in vivo*. Les souches témoins n'ont pas été testées lors de cet essai. Nous nous intéresserons principalement aux effets observés avec une dose virale de 100 PFU, puisqu'à une dose plus faible de 20 PFU, les pertes de poids étaient très modérées (de l'ordre de 5%) et ne permettaient pas de voir l'effet de l'infection virale (Figure 34).

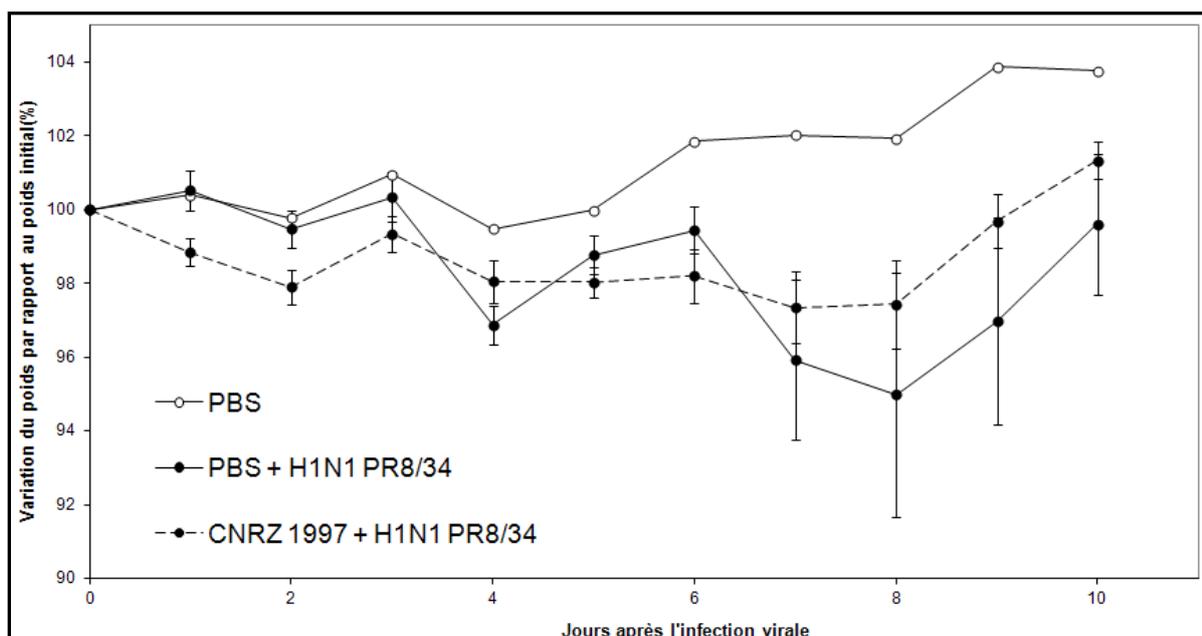


Figure 34 : Variation des poids des souris après infection virale à 20 PFU

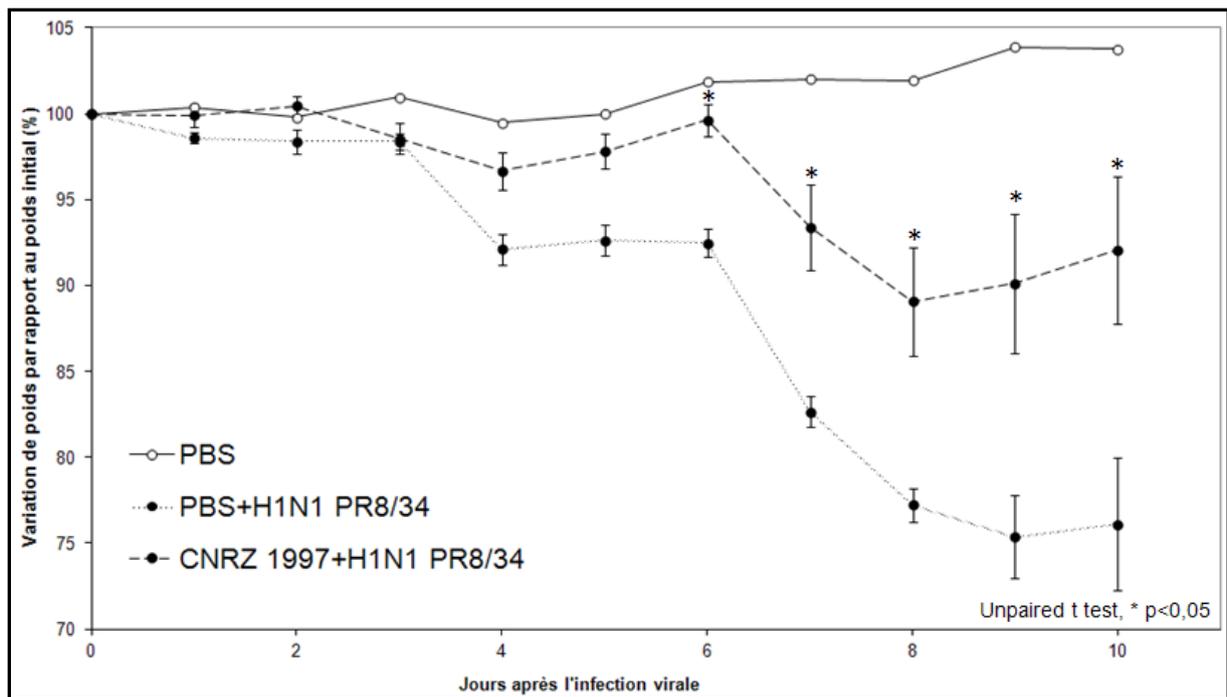


Figure 35 : Variation des poids des souris après infection virale à 100 PFU

Après infection des souris par une dose virale de 100 PFU (Figure 35), nous observons que les souris ayant reçu la souche CNRZ 1997 perdent moins de poids que les souris ayant reçu le virus seul. Dans les derniers jours de l'infection, cette perte de poids est significativement différente de celle du témoin. Nous décidons alors de nous focaliser sur les résultats avec la dose 100 PFU.

Afin de tester si l'administration de la souche CNRZ 1997 apporte un effet bénéfique aux souris, nous avons évalué, grâce à une échelle de scores visuels (Kawase, He et al. 2009) l'état des souris à partir du jour de l'inoculation du virus et jusqu'à 10 jours plus tard. Les résultats obtenus à J0 et J10 sont présentés dans la Figure 36.

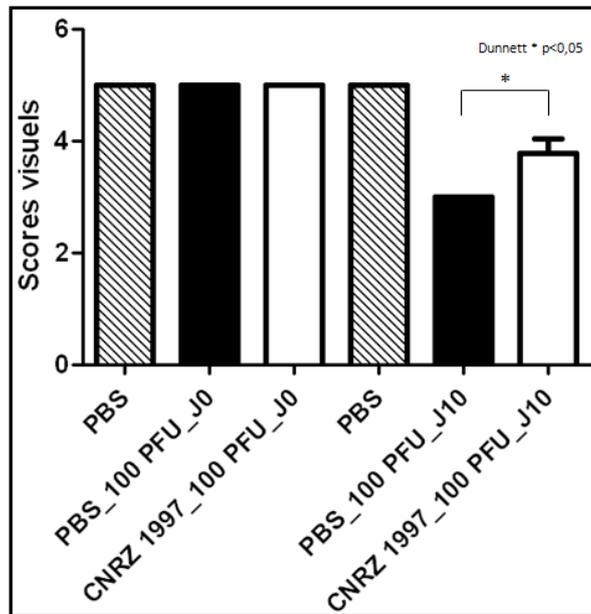


Figure 36 : Scores visuels des souris à J0 et J10

A J0 (date de l'infection virale), toutes les souris présentent un score de 5. En revanche, dix jours après les administrations orales quotidiennes avec la souche CNRZ 1997, les souris semblent mieux se porter (posture et réactivité des souris et aspect des pelages) que les souris témoins, avec un score de 3,78 ; alors que les souris témoins infectées par le virus présentent un score de 3. Ces résultats montrent que chez les souris, la souche CNRZ 1997 permet de diminuer significativement les symptômes cliniques post-infection virale.

Dans le but d'évaluer la charge virale dans les poumons des souris, nous avons gardé des souris vivantes jusqu'à J14 post-infection. La charge virale représente le logarithme du nombre de copies de génome viral dans 2,5 µg d'ARN total ; elle a été quantifiée à J10 et J14 post-infection (Figure 37). Elle a aussi été quantifiée chez les souris témoins ne recevant pas le virus et le résultat a montré, comme attendu, une absence totale du virus de la grippe.

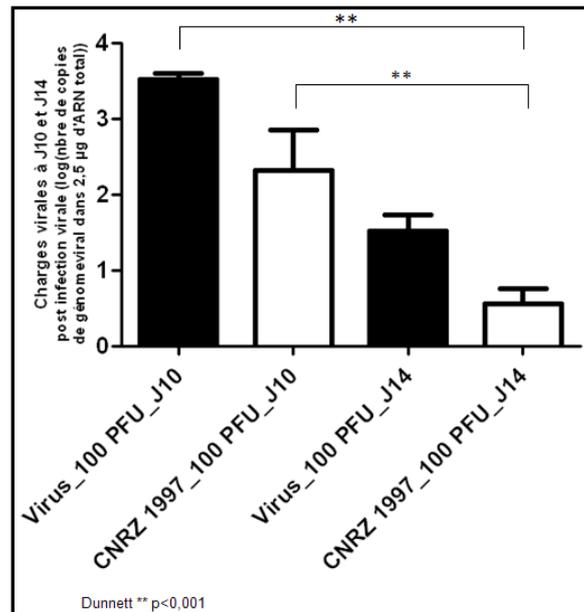


Figure 37 : Charges virales dans les poumons des souris à J10 et J14 post-infection virale

A J10 post-infection, nous observons des charges virales respectivement de 3,5 et de 2,3 pour les souris infectées par le virus et celles infectées par le virus et recevant quotidiennement la souche CNRZ 1997. Ce résultat suggère un apport bénéfique de la souche CNRZ 1997 aux souris infectées par le virus de la grippe. Pour confirmer cette observation, nous avons quantifié les charges virales chez des souris euthanasiées 14 jours après l'infection virale. A cette date, nous avons noté une différence non significative entre les valeurs obtenues chez les souris infectées par le virus et celles recevant en plus quotidiennement la souche CNRZ 1997. De plus, nous notons une baisse de la charge virale chez les souris infectées par le virus et traitées avec la souche CNRZ 1997 entre J10 et J14 de 76 % (contre seulement 57 % pour les souris témoins). A J14, ces souris ont presque achevé l'élimination du virus avec une charge virale de 0,5. Ce résultat suggère bien un effet positif de la souche CNRZ 1997 chez les souris, dans le cadre d'une infection virale par le virus H1N1 PR8/34.

3. Discussion

Ces dernières années, nous avons assisté à une augmentation des recherches tournées vers l'identification de souches probiotiques ayant un effet positif sur la diminution des infections virales. Ces recherches visent à mieux comprendre le lien entre la consommation de bactéries et la stimulation des défenses immunitaires innées. Une dizaine de souches, majoritairement des lactobacilles ont été ainsi identifiées, suite à des études *in vitro*, *in vivo* et parfois à l'échelle humaine : *B. breve* YIT4064 (Yasui, Nagaoka et al. 1994), *L. casei* Shirota

(Hori, Kiyoshima et al. 2002), *L. fermentum* CECT5716 (Olivares, Diaz-Ropero et al. 2007), *L. plantarum* L-137 (Maeda, Nakamura et al. 2009), *L. rhamnosus* LGG (Kawase, He et al. 2009; Harata, He et al. 2011), *L. gasseri* TMC0356 (Kawase, He et al. 2011), *L. plantarum* YU (Kawashima, Hayashi et al. 2011), *L. plantarum* 06CC2 (Takeda, Takeshita et al. 2011), *L. pentosus* b240 (Kobayashi, Saito et al. 2011), et *L. bulgaricus* OLL1073R-1 (Nagai, Makino et al. 2011). Des études ont aussi porté sur la potentialisation des effets de la vaccination par la consommation de produits probiotiques contenant des souches bactériennes immuno-modulatrices. Ces bactéries probiotiques permettent non seulement une augmentation de la réponse immunitaire, mais aussi son maintien tout le long de la consommation du produit (Boge, Remigy et al. 2009).

Malgré les effets démontrés des bactéries probiotiques, leurs mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés, mais quelques hypothèses ont été avancées. En effet, l'administration orale d'EPS acides extraits de la souche *L. delbrückii* OLL1073R-1 à des souris infectées par le virus de la grippe, a procuré une protection des souris. Cette protection a aussi été observée avec l'administration orale à des souris infectées par le même virus d'un yaourt fermenté avec la souche *L. delbrückii* OLL1073R-1 en plus de *L. bulgaricus* et *S. thermophilus*, suggérant que ces EPS acides sont à l'origine de l'effet immuno-modulateur de la souche (Nagai, Makino et al. 2011). Dans une autre étude, des chercheurs ont identifié des propriétés protectrices de la souche *L. plantarum* LpYU dans un modèle d'infection virale par la grippe. Ils ont aussi montré *in vitro* que les effets immuno-modulateurs de cette souche (production importante d'IL-12) étaient dépendants de TLR2, qui reconnaît le PEG et le LTA des bactéries Gram positives (Kawashima, Hayashi et al. 2011). Ces deux pistes nous semblent intéressantes pour identifier les mécanismes d'action de la souche CNRZ 1997.

Le but de cette étude était d'identifier une souche immuno-modulatrice aux propriétés probiotiques. Le critère choisi pour étudier les effets de la souche concernait l'atténuation des effets d'une infection virale par le virus de la grippe H1N1 PR8/34 adapté à la souris. La souche CNRZ 1997 (*L. plantarum*, profil pro-inflammatoire *in vitro*) a montré des effets protecteurs sur des souris infectées par une dose virale de 100 PFU du virus H1N1 PR8/34 i) en limitant les pertes de poids des souris suite à l'infection virale, ii) en atténuant les symptômes cliniques dus à la maladie et iii) en favorisant une élimination plus rapide du virus présent dans les poumons des souris.

Si nous avons choisi de tester des bactéries vivantes par voie orale, en corrélation avec l'utilisation ultérieure de la souche potentiellement probiotique en industrie, des études

montrent que des bactéries tuées par la chaleur et administrées oralement peuvent aussi moduler la réponse immunitaire des souris et offrir une protection contre les infections virales (Maeda, Nakamura et al. 2009; Kobayashi, Saito et al. 2011; Takeda, Takeshita et al. 2011). D'autres chercheurs ont testé l'administration intra-nasale de BL tuées par la chaleur dans un modèle d'infection virale chez la souris. Les résultats ont montré que la souche *L. gasseri* TMC0356, par exemple, offrait une protection aux souris contre le virus de la grippe en stimulant les réponses immunitaires médiées par les cellules respiratoires (Harata, He et al. 2011).

Dans le cadre de notre étude, nous avons comparé l'administration orale de la souche LGG vivante (pendant 10 jours avant et 10 jours après l'infection virale) et l'administration intra-nasale (pendant 3 jours avant et 3 jours après l'infection virale) de cette souche lyophilisée. Les résultats (non présentés) ont montré que l'administration intra-nasale de la souche LGG à des souris infectées par des doses virales de 2000 et 200 PFU permettaient une meilleure protection que les administrations orales de la LGG vivante. L'efficacité de la souche administrée par voie nasale par rapport à la voie orale pourrait être expliquée par le fait que la souche se retrouve directement en contact avec le NALT, ce qui lui permet d'exercer rapidement ses effets positifs. Nous n'avons pas testé cette voie d'administration pour la souche CNRZ 1997 parce qu'elle n'est pas compatible avec l'utilisation industrielle ultérieure de cette souche.

Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux obtenus par l'équipe d'Obata qui a testé une souche de *L. plantarum* (LpYU) avec un profil pro-inflammatoire *in vitro* dans un modèle d'infection virale avec le virus H1N1 (A/NWS/33). Cette souche a été administrée oralement (3 doses testées : 0,011 ; 0,21 et 2,1 mg/jour) aux souris 7 jours avant l'infection virale et 7 jours plus tard. L'administration de cette souche a permis une diminution des pertes de poids des souris aux 3 doses testées en comparaison avec le témoin ; 14 jours après l'infection virale, ces souris ont retrouvé leurs poids de départ. Après sacrifice des souris, les auteurs ont noté une diminution de la charge virale dans les poumons et les BALF des souris. Cette diminution était croissante en fonction de la dose bactérienne administrée (Kawashima, Hayashi et al. 2011).

Le complément alimentaire fabriqué à partir de la souche CNRZ 1997 est en cours d'analyse par nos partenaires industriels pour i) évaluer la fonctionnalité du produit dans le temps et ii) optimiser au maximum son procédé de fabrication. Une étude humaine multicentrique, aléatoire et en double aveugle avec le complément alimentaire fabriqué avec

la souche CNRZ 1997 et son placebo, est en cours d'étude pour la saison hivernale actuelle. Pour des raisons de confidentialité, nous ne pourrions pas donner de détails sur cette étude clinique. Les perspectives de cette étude concernent principalement l'identification du mécanisme d'action de cette souche bactérienne. Pour cela, il faudrait identifier le composant de la bactérie (EPS, LTA, PEG...) impliqué dans les propriétés immuno-modulatrices de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Applied and Environmental Microbiology » et sont présentés dans l'annexe 3.

IV. Identification de souches ayant un effet contre les inflammations intestinales

Nous présentons dans cette section les résultats que nous avons obtenus lors de la recherche de souches immuno-modulatrices ayant un effet contre les inflammations intestinales sur la base d'essais *in vivo*.

1. Contexte de l'étude

Les MICI représentent un problème de santé mondial, dont les causes ne sont pas clairement définies. Les traitements actuels sont composés essentiellement d'immunosuppresseurs et de corticoïdes. Cependant, depuis quelques années, la recherche de nouvelles pistes de prévention de ces maladies a mis en évidence l'intérêt d'étudier des souches de BL présentant des propriétés anti-inflammatoires. En effet, la consommation de ces bactéries par des patients atteints de MICI pourrait limiter l'inflammation.

Dans le cadre de cette étude, nous avons testé chez la souris les propriétés potentiellement anti-inflammatoires de 3 souches bactériennes que nous avons identifiées grâce au criblage *in vitro*. Nous avons choisi pour cela un modèle largement utilisé par la communauté scientifique et par notre équipe : le modèle d'inflammation au DSS.

2. Résultats

Lors d'un premier essai *in vivo* avec une dose de 3% de DSS, nous avons testé 3 souches issues du double screening *in vitro*. Nous avons utilisé pour cet essai des souris mâles BALB/c âgées de 7 semaines. Les souris ont reçu les souches de *L. paracasei* VEL12195, *B. longum* VEL12270 ou *B. bifidum* VEL12329 par des administrations orales à une dose de 5×10^9 UFC/souris, pendant 7 jours avant l'induction de l'inflammation et 7 jours plus tard. Nous avons suivi les pertes de poids en calculant les variations de poids des souris par rapport à leur poids de départ (Figure 38), ainsi que les DAI des souris de J0 à J7 post-inflammation (Figure 39).

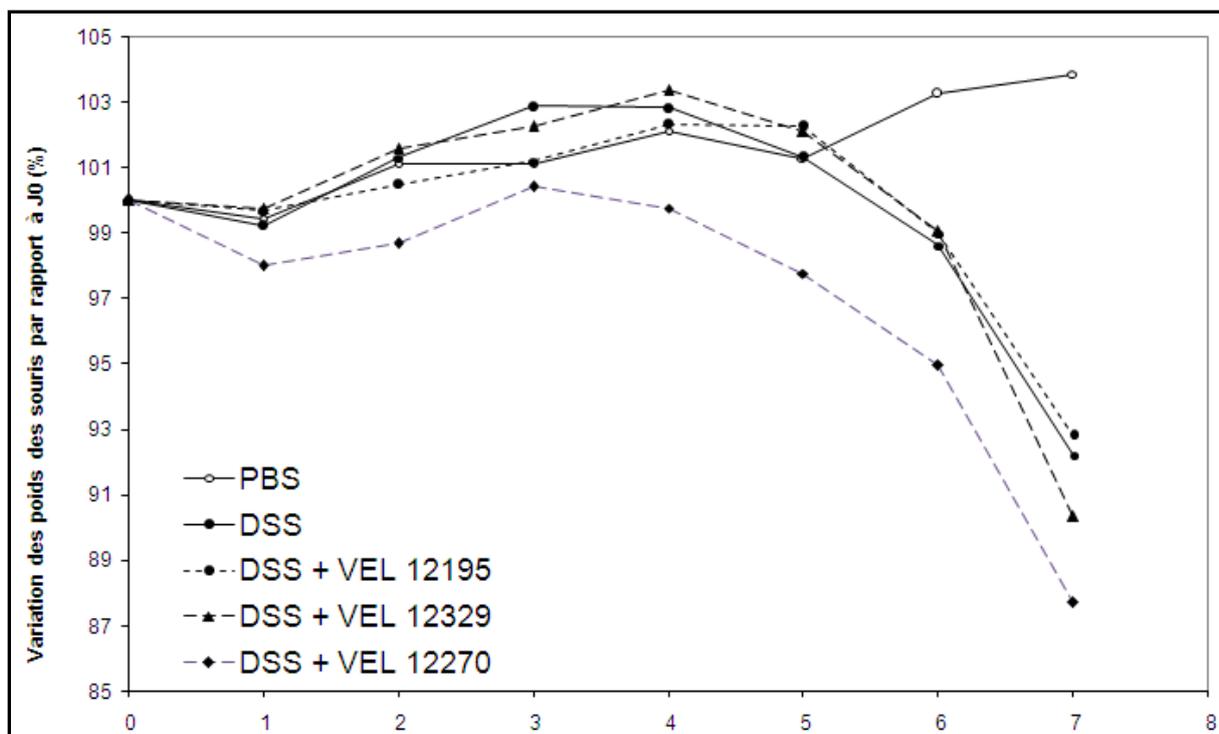


Figure 38 : Variations des poids des souris BALB/c à partir de J0 et jusqu'à J7

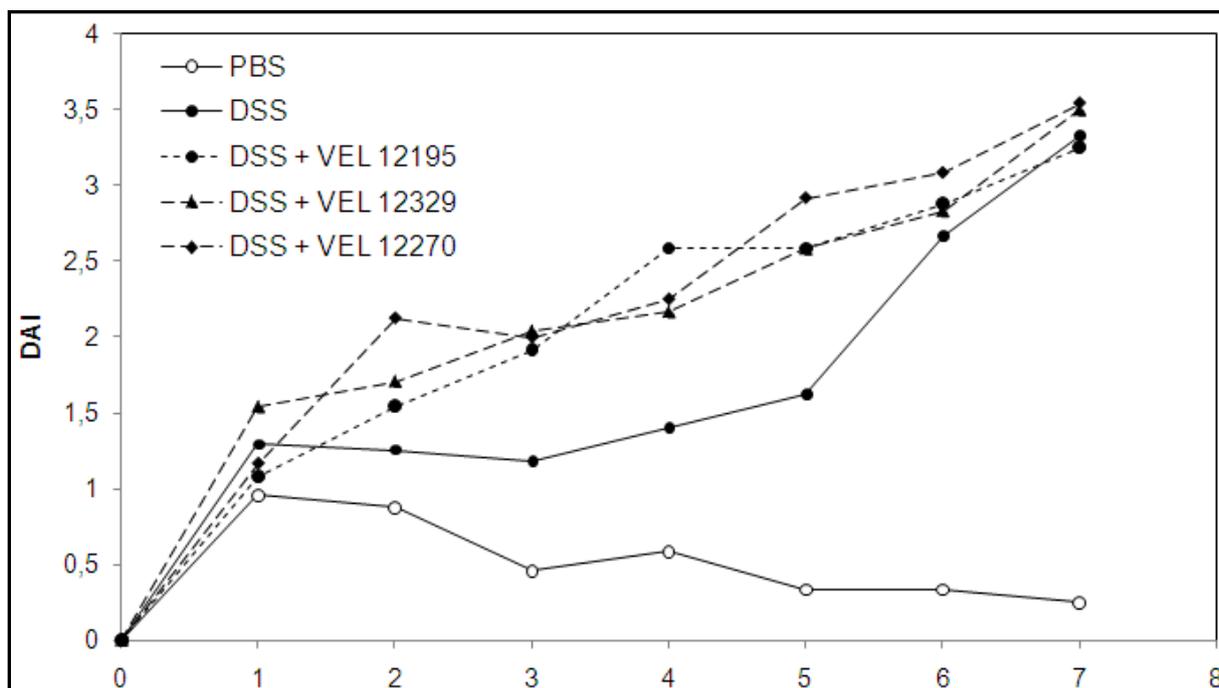


Figure 39 : Variations du DAI des souris BALB/c à partir de J0 et jusqu'à J7

Le résultat des variations de poids chez les souris BALB/c traitées ou non au DSS à 3% est présenté dans la Figure 38. Les pertes de poids maximales, sont notées en fin d'expérience à J7, et sont de l'ordre de 8%. Les DAI notés tous les jours après l'induction de

l'inflammation (Figure 39) augmentent à partir du premier jour et atteignent un score proche de 3 pour les deux lots de souris traités au DSS. Ce suivi de l'état clinique des souris ne permet pas d'identifier un effet bénéfique des 3 souches testées dans ce modèle d'inflammation.

Après sacrifice des souris, nous avons analysé les scores macroscopiques relevés sur les côlons des souris des différents lots (Figure 40).

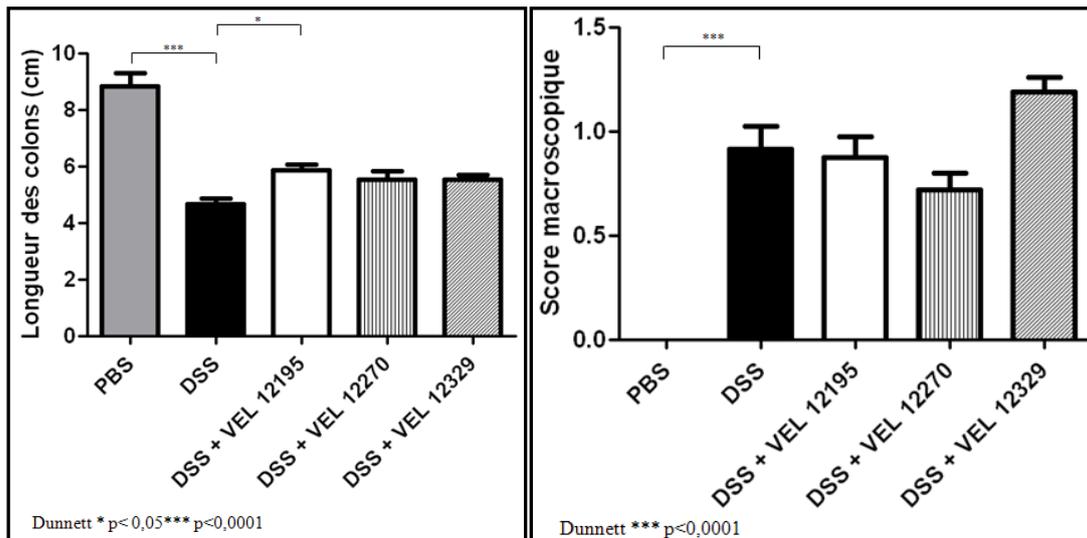


Figure 40 : Scores macroscopiques sur les côlons des souris BALB/c

Pour le paramètre longueur des côlons, nous observons une amélioration significative de ce paramètre chez les souris traitées au DSS et ayant reçu la souche VEL12195 en comparaison avec les deux lots de témoins. Les souches VEL12270 et VEL12329 montrent des côlons légèrement plus longs que le témoin DSS. Pour le score macroscopique calculé à partir des observations réalisées sur les côlons, nous n'observons pas de diminution de ce score pour les souris après traitement avec la souche VEL12195 en comparaison avec les souris témoins du lot DSS. La souche VEL12270 montre une diminution non significative de ce paramètre, alors que pour la souche VEL12329, nous observons un score supérieur à celui du témoin.

Le dosage des cytokines, ainsi que le dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO) n'ont pas été concluants lors de cet essai. En effet, nous n'avons pas observé de différence entre les différents lots testés. Par ailleurs, l'administration des bactéries potentiellement anti-inflammatoires n'a pas permis de modifier les taux des cytokines dosées. Ce résultat ne

signifie pourtant pas que ces bactéries ne sont pas capables de moduler le système immunitaire de l'hôte.

Le résultat de l'analyse histologique réalisée sur un morceau de côlon est présenté dans la Figure 41.

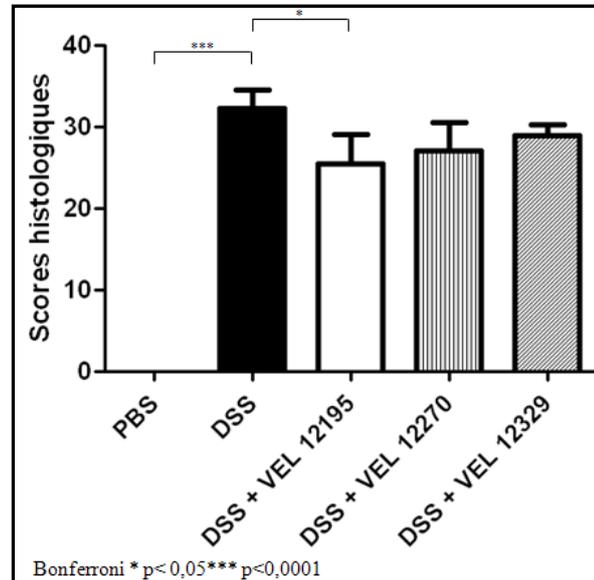


Figure 41 : Scores histologiques sur les côlons des souris BALB/c

L'analyse histologique a révélé un score autour de 30 pour les souris témoins traitées au DSS. Ce score est diminué significativement après traitement des souris avec la souche VEL12195.

Les résultats obtenus lors de ce premier essai, bien que ne permettant pas de confirmer les effets anti-inflammatoires des 3 souches bactériennes testées, nous ont conduits à tester la souche *L. paracasei* VEL12195 avec une autre dose de DSS. Lors de ce nouvel essai, la dose de DSS est fixée à 2,5 % (même lot que pour le précédent essai) afin de diminuer le niveau d'inflammation que nous avons jugé élevé avec la dose de 3 %. Une autre race de souris est utilisée, C57BL/6, connue pour être plus résistante à l'inflammation que les souris BALB/c.

Lors de ce nouvel essai, nous avons inclus deux lots supplémentaires de souris afin de tester deux souches bactériennes témoins et valider ainsi le modèle mis en place : la souche *L. delbrueckii* CNRZ 327 précédemment identifiée comme souche anti-inflammatoire dans un modèle d'inflammation intestinale induite avec 3 % de DSS (Santos Rocha, Lakhdari et al. 2011) et la souche *L. rhamnosus* LGG qui a montré dans certaines études une exacerbation des effets de la colite chez l'animal (Geier, Butler et al. 2007; Claes, Lebeer et al. 2010).

Le déroulement de l'essai est le même que pour le précédent. Les souris reçoivent une administration orale journalière pendant 7 jours avec les souches bactériennes à une dose de

5×10^9 UFC/souris. A partir de J0 et jusqu'à J7, le DSS à 2,5 % est administré aux souris dans l'eau de boisson et les souris continuent à recevoir les souches par administrations orales. Les pertes de poids des souris et les DAI sont notées à partir de J0 sont présentés dans les figures 42 et 43.

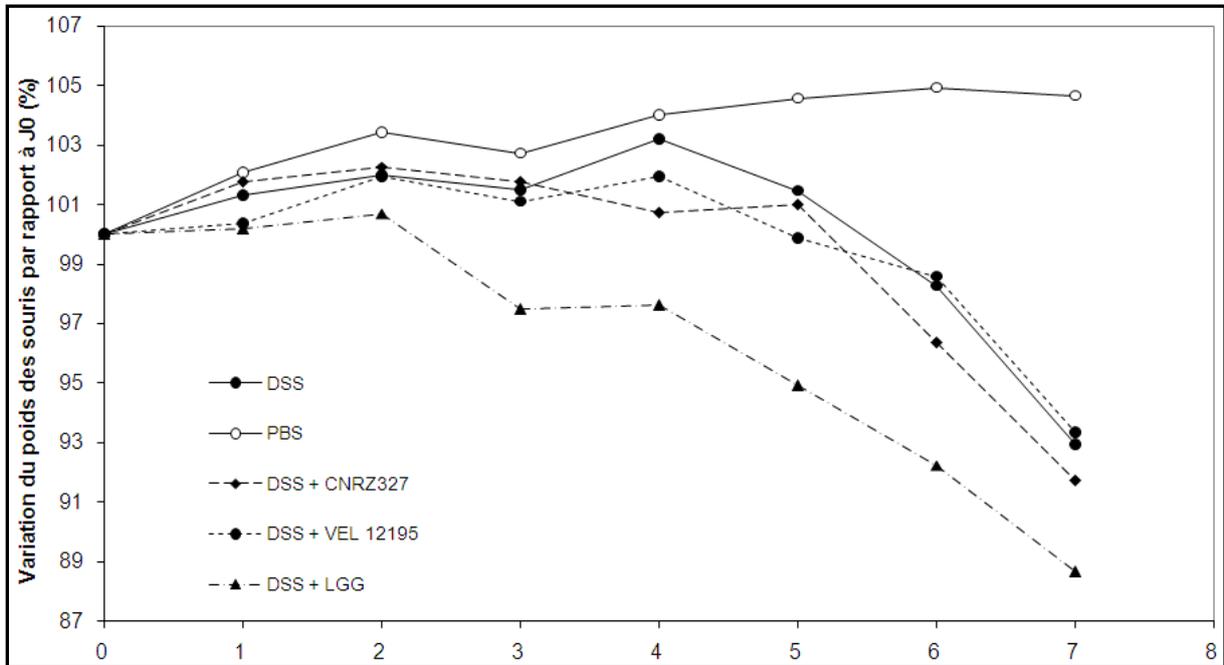


Figure 42: Variations des poids des souris C57BL/6 à partir de J0 et jusqu'à J7

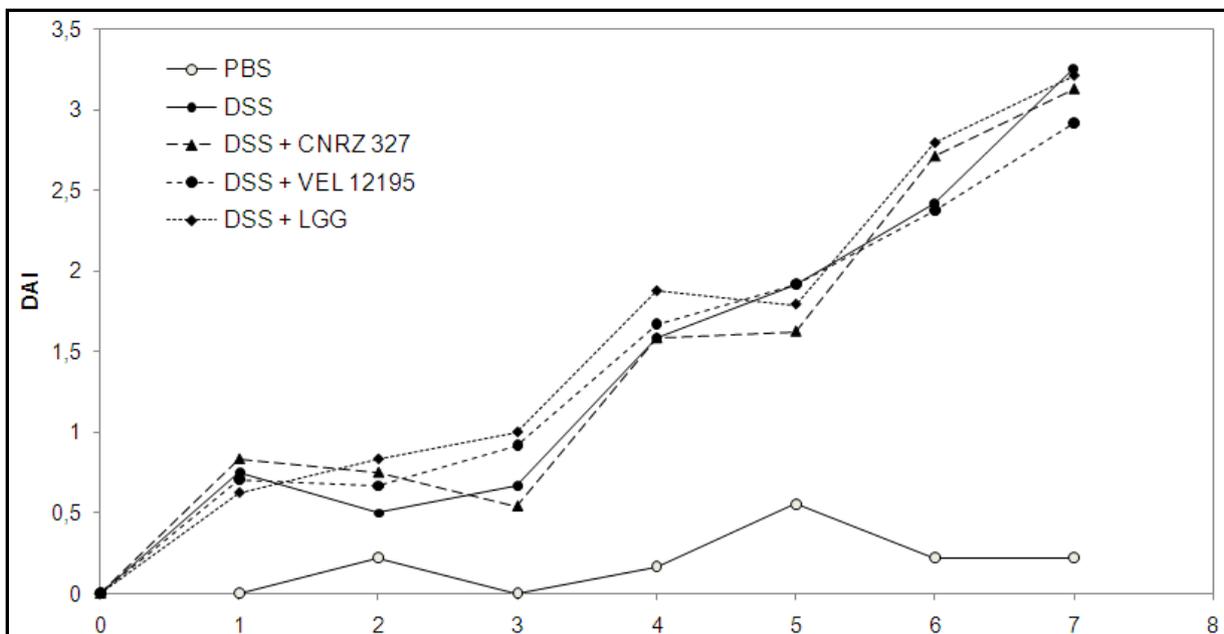


Figure 43 : Variations du DAI des souris C57BL/6 à partir de J0 et jusqu'à J7

Comme nous l'avons noté pour l'essai précédent, les pertes des poids pour les lots DSS, CNRZ 327 et VEL12195 sont aux alentours de 8% à J7 (Figure 40). Par contre, les

souris du lot LGG perdent plus de poids sur toute la durée de l'essai. A la fin de l'essai, les souris ont perdu 11% de leur poids initial. Les DAI (Figure 41) suivent sensiblement le même profil pour tous les lots. A J7, tous les lots traités au DSS ont un DAI autour de 3, sauf le lot VEL12195 qui présente un DAI légèrement inférieur à 3.

Après sacrifice des souris, nous avons mesuré les longueurs de côlons et les scores macroscopiques relevés sur les côlons des souris des différents lots (Figure 44).

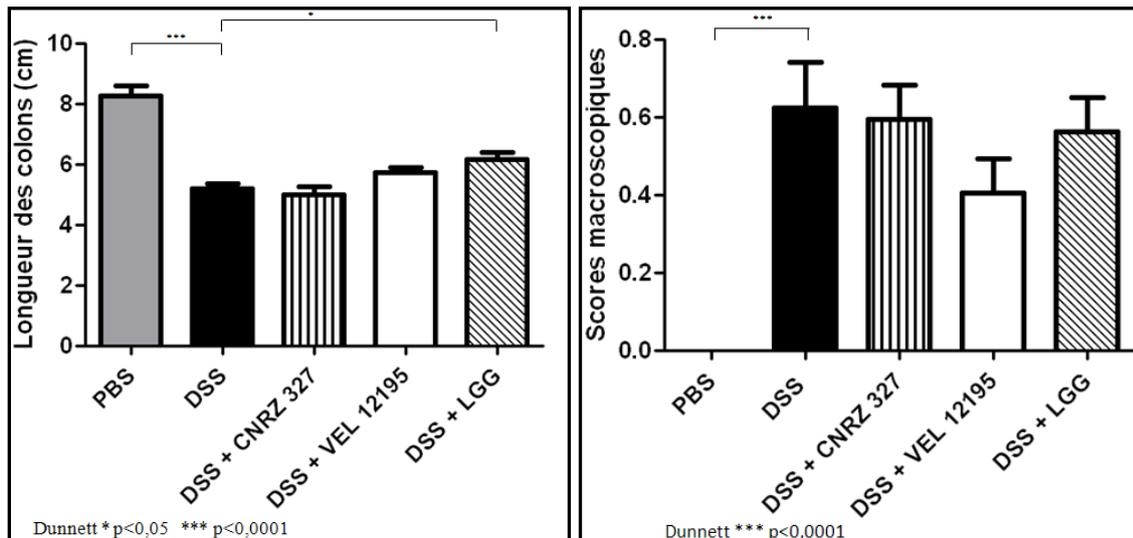


Figure 44 : Scores macroscopiques sur les côlons des souris C57BL/6

En comparant les longueurs des côlons entre les deux essais, nous observons les mêmes mesures pour les deux essais. Les souris saines et traitées au DSS présentent respectivement des longueurs de côlons de 8 cm et 5 cm. Nous notons une différence significative entre les longueurs des côlons des souris traitées et non traitées au DSS. Nous observons aussi une amélioration de la longueur des côlons des souris traitées avec la souche LGG (malgré la perte de poids importante des souris). Pour les souris traitées avec les souches VEL12195 ou CNRZ 327, aucune différence significative n'est observée en comparaison avec le témoin DSS pour ce paramètre. Les scores macroscopiques montrent une différence significative entre les témoins PBS et DSS. Les souches CNRZ 327 et LGG affichent des scores équivalents à celui du lot DSS. En revanche, la souche VEL12195 montre un score inférieur, en comparaison avec les différents lots, cependant, cette diminution n'est pas significativement différente du lot témoin DSS.

Lors de ce nouvel essai, et comme pour le précédent, le dosage des cytokines, ainsi que le dosage de l'activité MPO n'ont pas été concluants.

L'analyse histologique réalisée sur un morceau de côlon, est présentée dans la Figure 45. Elle montre un score histologique pour le témoin DSS bien inférieur à celui obtenu lors de l'essai précédent (15 contre 30). Cette observation montre que la diminution de la dose de DSS à 2,5% et/ou le changement de race des souris utilisées, ont eu pour effet de diminuer les scores histologiques. Seul le lot de souris traitées avec la souche CNRZ 327 a montré une diminution du score histologique (non significative). Les lots de souris traités avec les souches VEL12195 et LGG montrent des scores histologiques légèrement supérieurs au lot témoin DSS 2,5%.

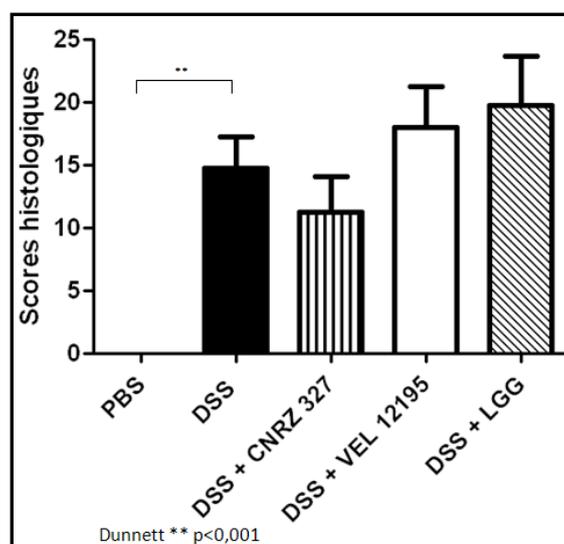


Figure 45 : Scores histologiques sur les côlons des souris C57BL/6

Malgré les deux modèles d'inflammation intestinale *in vivo* induites au DSS mis en place pour l'identification de souches probiotiques anti-inflammatoires, ce travail n'a pas permis de mettre en évidence des propriétés anti-inflammatoires nettes des 3 souches testées, et en particulier de la souche *L. paracasei* VEL12195. Les tendances observées avec cette souche dans le premier essai, nous ont amenés à l'étudier à nouveau en i) diminuant la dose de DSS de 3 à 2,5 % et ii) changeant la race des souris BALB/c par des C57BL/6. La concentration des bactéries administrées aux souris reste par contre inchangée (5×10^9 UFC/souris). Cependant, sur les 7 souches anti-inflammatoires identifiées avec le double criblage *in vitro*, nous n'en avons testé que 3. Il nous reste donc encore une possibilité pour identifier *in vivo*, des souches ayant des propriétés anti-inflammatoires *in vitro*.

3. Discussion

Le but de cette étude était de déterminer, en utilisant un modèle d'inflammation intestinale, si l'apport d'une souche de BL identifiée comme anti-inflammatoire *in vitro* et délivrée par voie orale à des souris pouvait limiter le déclenchement et les dommages épithéliaux dus à l'inflammation intestinale causée par l'administration de DSS pendant 7 jours à une dose de 3% chez des souris BALB/c.

Nous avons basé notre protocole *in vivo* pour étudier les propriétés anti-inflammatoires des souches sélectionnées suite au double criblage *in vitro* sur celui publié par Santos Rocha *et al.* pour l'identification des propriétés anti-inflammatoires de la souche *L. delbrueckii* CNRZ 327 (souche identifiée lors d'une étude menée au sein de notre équipe) (Santos Rocha, Lakhdari *et al.* 2011). Cependant il existe deux différences entre les protocoles : i) des lots différents de DSS sont utilisés, bien que la dose soit la même (3%) et ii) nous avons administré nos bactéries en phase stationnaire aux souris, alors que la souche CNRZ 327 était administrée en phase exponentielle. Lors des deux essais menés, les auteurs ont observé une mortalité au niveau des différents lots de souris traitées au DSS, que nous n'avons pas observée lors de notre essai. Cependant, sur les 4 souches bactériennes que les auteurs ont testées, la souche CNRZ 327 permet d'avoir des côlons significativement plus longs que ceux du témoin DSS. L'apport bénéfique de la souche CNRZ 327 se traduit aussi par la diminution des scores macroscopiques et histologiques au niveau des côlons (Santos Rocha, Lakhdari *et al.* 2011).

Une autre étude a été menée avec des souris BALB/c (moitié mâles et moitié femelles, âgées de 6 semaines) et à une dose de DSS de 5% dans le but d'étudier les propriétés anti-inflammatoires de 4 souches bactériennes *L. acidophilus*, *C. butyricum*, *B. adolescentis* et *E. faecalis*. Les souris sont traitées au DSS pendant 13 jours et les souris témoin perdent à la fin de l'essai 15 % de leur poids initial au maximum. Les paramètres testés lors de cette étude sont identiques à ceux que nous avons étudiés : pertes de poids, DAI, scores macroscopiques, scores histologiques et dosage de l'activité MPO. Les résultats obtenus ont montré des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* pour toutes les souches testées, avec un avantage pour la souche *E. faecalis* (Chen, Wang *et al.* 2009). Ces résultats, différents des nôtres, malgré une dose de DSS presque doublée, montrent qu'en utilisant des lots de DSS différents, il est difficile de comparer les résultats obtenus d'une étude à une autre dans des contextes différents. En effet, si avec une dose de 3% DSS, nos souris témoins perdent au maximum 3g pendant toute la durée de l'essai, l'équipe de Chen a montré que sur une durée plus longue et

avec une dose de DSS plus importante, leurs souris perdent presque le même poids que nos souris témoins.

Dans les conditions de notre étude, après une administration de DSS à 3% dans l'eau de boisson des souris, les trois souches VEL12195, VEL12270 et VEL12329 n'ont pas réussi à atténuer les effets causés par l'inflammation. Cependant, nous avons observé lors de cet essai qu'après une semaine d'administration intra-gastrique de la souche VEL12195 à une dose de 5×10^9 UFC/souris, la longueur des côlons des souris ne diminuait pas suite à l'administration de DSS à 3% en comparaison avec les souris témoins. Ce résultat nous a encouragés à tester cette souche dans un modèle murin utilisant une autre race de souris mâles C56BL/c à une dose de DSS plus modérée de 2,5%.

Ce second essai ne nous a pas permis de mettre en évidence les propriétés anti-inflammatoires de la souche VEL12195. De plus, nous n'avons pas pu reproduire des résultats déjà observés (à une dose légèrement plus importante de DSS) de la souche *L. delbrueckii* CNRZ 327.

Néanmoins, lors de ces essais, nous n'avons étudié que 3 souches identifiées *in vitro*. Il nous reste donc 4 autres souches bactériennes potentiellement anti-inflammatoires à tester.

V. Identification de souche bactérienne anti-oxydante

Nous présentons dans cette section les résultats que nous avons obtenus lors de la recherche de souches anti-oxydantes *in vivo*.

1. Contexte de l'étude

Le stress oxydant, par le biais des DAO, peut causer de nombreux dégâts chez l'homme. Plusieurs études ont montré les effets positifs de certaines BL en limitant les effets de ce stress (Kullisaar, Zilmer et al. 2002; Kullisaar, Songisepp et al. 2003; Wang, Yu et al. 2006; Ejtahed, Mohtadi-Nia et al. 2011; Hathout, Mohamed et al. 2011).

Afin d'identifier des souches bactériennes aux propriétés anti-oxydantes, nous avons mis au point un modèle *in vivo* basé sur une alimentation déficiente en sélénium et en vitamine E. Ce régime est capable d'induire un stress oxydant modéré chez les rongeurs quelques semaines après le début de sa prise (Yang, Hill et al. 1989; Mazur, Nassir et al. 1996; Shalini and Bansal 2007). Pour valider ce modèle, nous avons choisi la souche *L. fermentum* Me-3 comme souche anti-oxydante témoin (Kullisaar, Zilmer et al. 2002; Kullisaar, Songisepp et al. 2003; Mikelsaar and Zilmer 2009).

La difficulté rencontrée lors de la mise en place de ce modèle d'étude *in vivo* était le choix des marqueurs permettant d'apprécier l'importance du stress oxydant ainsi que l'effet des bactéries que nous testerons chez la souris. En effet, ces marqueurs pour être valables, devraient être i) des produits majeurs de modifications oxydantes, ii) des produits stables qui ne sont pas perdus au cours du stockage, et mesurables dans les limites de détection d'une procédure d'analyse fiable, et iii) déterminés par un test spécifique, sensible, reproductible et robuste (Griffiths, Moller et al. 2002).

C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers le laboratoire Laraspiral, spécialiste du domaine de l'oxydation. Nous avons donc opté pour le test breveté KRL® que le laboratoire a mis en place, pour l'analyse des niveaux d'oxydation du sang des souris. Outre le sang, les foies des souris ont été sélectionnés pour évaluer l'effet du stress oxydant par i) le test KRL, ii) le dosage des deux formes de glutathion et iii) le dosage des MDA qui reflète la peroxydation des lipides.

2. Résultats

Les tests KRL réalisés sur le sang ou les foies congelés des souris (ayant perdu les dynamiques des cellules vivantes) sont une variante du test KRL, qui est d'habitude réalisé sur du sang frais. Ce test modifié est réalisé avec un sang témoin auquel on ajoute l'élément décongelé, comme s'il s'agissait d'un modulateur oxydant.

Après 6 semaines de carence alimentaire pour les souris et avant le début des gavages, nous avons analysé le sang des souris carencées/non carencées en utilisant le test KRL. Les résultats obtenus indiquent clairement un effet de la carence alimentaire chez les souris nourries avec le régime carencé et nous permet de valider le modèle mis en place. A la fin des 4 semaines de gavages, pendant lesquels les souris reçoivent toujours le régime carencé, nous effectuons une nouvelle analyse avec le test KRL sur les sangs congelés (Figure 46).

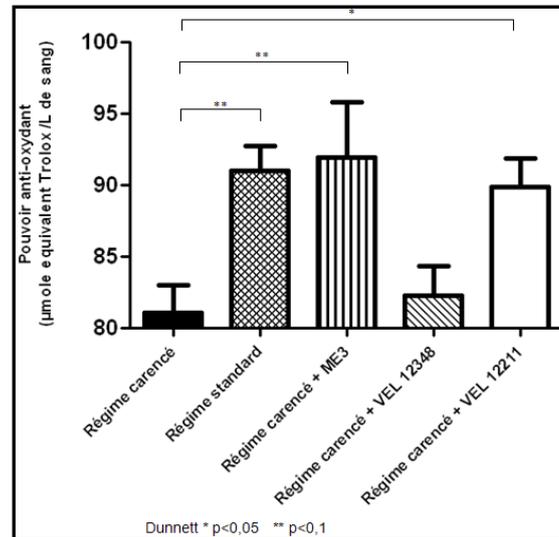


Figure 46: Propriétés anti-oxydantes globales (KRL sur les sangs congelés) pour les différents lots de souris

D'après la Figure 46 ci-dessus et en comparant le régime normal au régime carencé, l'effet de la carence en sélénium et en vitamine E est bien présent puisqu'une différence significative est constatée entre les deux lots de souris. Les souris traitées avec la souche Me-3 montrent le taux le plus élevé d'équivalent trolox/L de sang, suivie par le lot traité avec la souche VEL12211. Ces souris montrent aussi une différence significative avec les souris recevant le régime carencé. La souche VEL12348 ne semble pas avoir d'effet positif avec ce marqueur. La différence obtenue avec ce paramètre entre les deux souches testées montrent qu'il pourrait y avoir une part nutritionnelle apportée par les bactéries qui serait susceptible,

notamment d'apporter du Sélénium, mais du fait des différences observées entre les souches, le test KRL est plutôt en faveur d'un effet supplémentaire, lié à chaque souche.

L'étude des propriétés anti-oxydantes des souches sélectionnées a aussi été testée avec le test KRL sur les foies des souris des différents lots (Figure 47).

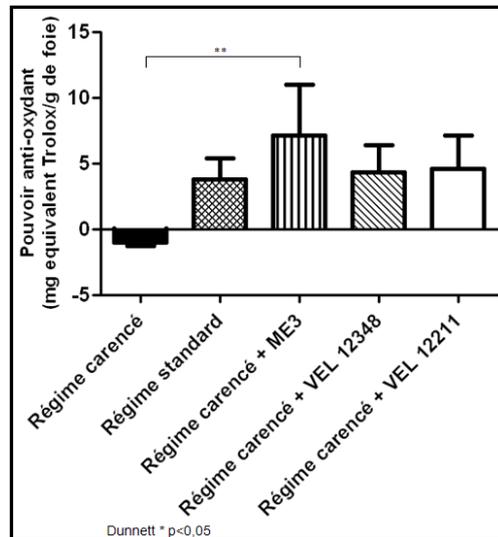


Figure 47 : Propriétés anti-oxydantes globales (test KRL sur les foies) pour les différents groupes de souris

Les valeurs négatives observées pour le lot témoin carencé indiquent la présence de molécules pro-oxydantes. A nouveau, en comparant le régime normal au régime carencé avec le test KRL au niveau des foies, une différence (non significative) est constatée entre les deux lots de souris. La souche Me-3 montre le taux le plus élevé d'équivalent trolox/L de sang et une différence significative avec le lot de souris alimenté avec le régime carencé. Les souches VEL12211 et VEL12348 montrent des niveaux équivalents d'équivalent trolox/L de sang à ceux obtenus avec le régime standard, mais aucune différence significative n'est notée avec le lot témoin carencé.

Les différences obtenues dans les résultats KRL sur les sangs congelés et les foies congelés sont dues au fait que le sang contient des composants circulants et donc la résistance anti-radicalaire est régulée, contrairement au foie où les composants sont accumulés et non circulants et il n'y a donc peu ou pas de régulation à ce niveau.

Nous avons aussi dosé les MDA, reflétant la peroxydation des lipides au niveau des foies (Figure 48).

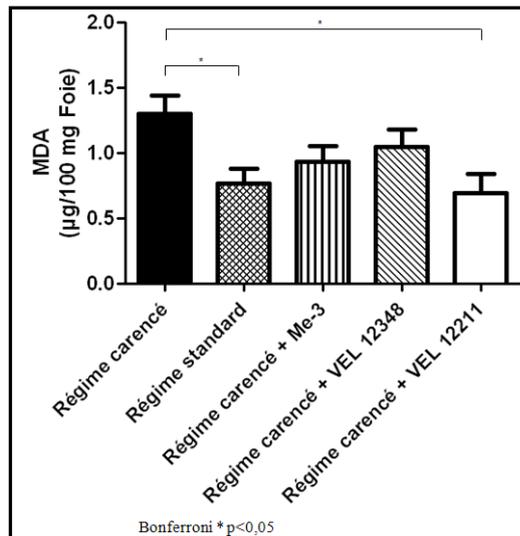


Figure 48 : Peroxydation lipidique par quantification du MDA dans les foies pour les différents groupes de souris

Le dosage des MDA au niveau des foies montre une différence significative entre les lots de souris alimentés par les régimes carencé et standard. Une différence significative entre les lots de souris carencés et traités avec la souche VEL12211 est mise en évidence. L'apport de cette souche chez les souris recevant l'alimentation carencée montre donc une diminution de la peroxydation des lipides. Les souches Me-3 et VEL12348 diminuent les concentrations en MDA, mais de manière non significative.

Au niveau des foies, nous avons aussi dosé le glutathion sous ses formes réduites et oxydées ce qui nous a permis de calculer le rapport glutathion oxydé GSSG/glutathion réduit GSH (Figure 49).

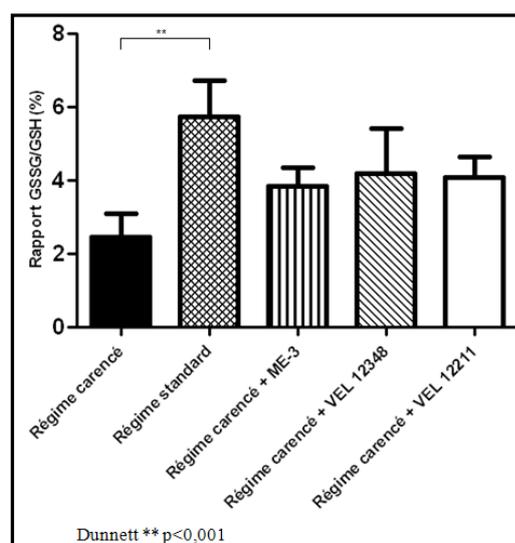


Figure 49 : Rapport GSSG/GSH pour les différents lots de souris

Les rapports GSSG/GSH montrent une différence significative entre les lots recevant l'alimentation carencée ou standard. Les 3 souches testées montrent des ratios intermédiaires, similaires et non significatifs par rapport au lot carencé. Les rapports GSSG/GSH ne sont pas conformes à ceux attendus. En effet, en présence d'un élément anti-oxydant, les valeurs de GSH devraient augmenter, ce qui implique une diminution du ratio GSSG/GSH. Or dans notre cas, le rapport GSSG/GSH est plus important chez le lot de souris recevant l'aliment standard que celui alimenté par le régime carencé. Nous avons alors analysé les résultats des dosages de GSH et GSSG (Figure 50), puisque le ratio GSSG/GSH doit être interprété avec précaution.

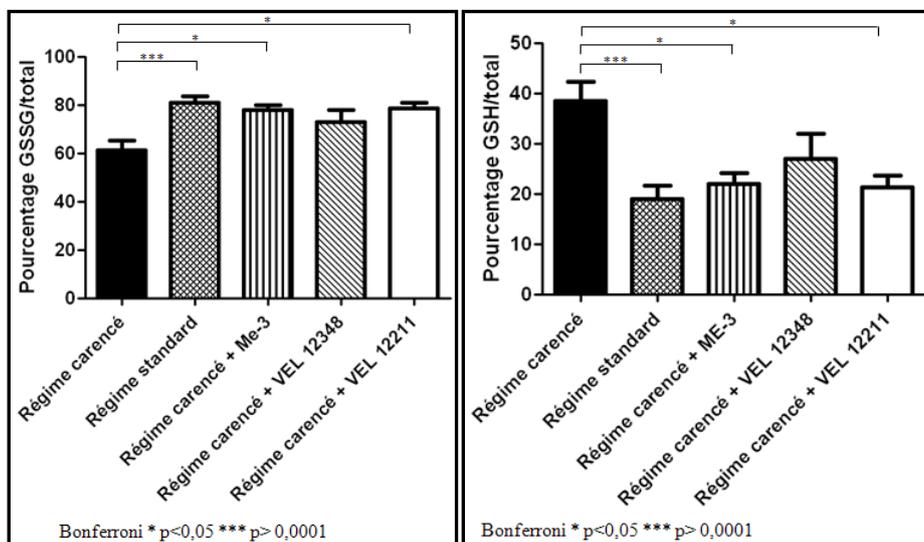


Figure 50: Valeurs GSSG/total et GSH/total dosées dans les foies pour les différents lots de souris

Les résultats de dosage du glutathion sous ses deux formes montrent que pour la forme oxydée du glutathion GSSG est plus présente chez les souris alimentées au régime normal. Une différence significative est observée entre les lots de souris alimentés au régime carencé seul, ou en présence des bactéries Me-3 et VEL12211. Au contraire, la forme réduite du glutathion GSH est plus présente dans le témoin carencé que dans le témoin alimenté au régime standard. De même que pour le GSSG, une différence significative est observée entre les lots de souris alimentés au régime carencé seul, ou en présence des bactéries Me-3 et VEL12211. Rappelons que dans ce modèle, le stress oxydant est induit par une carence alimentaire en sélénium et en vitamine E chez les souris. Or, l'enzyme GPx est sélénium dépendante. Si le sélénium est en quantité moindre, il en résulte une activité enzymatique réduite. Il en résulte une accumulation de DAO et le GSH ne pourra pas jouer son rôle de

molécule détoxifiante du stress oxydant. En effet, elle intervient notamment dans la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en molécule d'eau. Chez les souris subissant un fort stress oxydant lié à la carence en sélénium, on pourrait donc avoir préférentiellement la forme réduite GSH par rapport à la forme oxydée GSSG. Ainsi, il apparaît des concentrations en GSH/total dans le lot carencé plus importantes que dans le lot témoin régime standard et au contraire de faibles concentrations en GSSG/total dans le lot carencé en comparaison avec le lot standard. La production de SOD identifiée *in vitro* par les bactéries (par nos collègues du GPMA) permettrait de se substituer à l'action de la GSH puisque cette enzyme détoxifie également les ROS. L'apport des souches bactériennes Me-3 et VEL12211 permet donc d'atténuer l'état de stress oxydant observé chez les lots témoins carencés. Sur ce paramètre, la souche *L. zea* VEL12211 montre de meilleures capacités anti-oxydantes que la souche VEL12348.

3. Discussion

Au niveau de la littérature, la souche *L. fermentum* Me-3 est l'une des souches anti-oxydantes les mieux caractérisées. En effet, cette souche a été étudiée *in vitro*, *in vivo* chez des souris ainsi que chez l'homme (volontaires sains et patients). Cette souche isolée en 1994 à partir de fèces d'enfants estoniens, tolère *in vitro* des variations de pH 4 à pH 2,5 ainsi que des concentrations de sels biliaires de 0,3 à 2%. Elle a été étudiée dans un modèle murin d'infection par *S. typhimurium* et a montré une correction de la peroxydation lipidique et la diminution du ratio glutathion GSSG/GSH chez les souris infectées. Lors d'une étude clinique chez des volontaires sains, l'apport de cette souche dans leur alimentation a permis une augmentation du nombre de lactobacilles dans les fèces des volontaires. Cette augmentation de lactobacilles implique une colonisation du microbiote par des bactéries qui pourraient lutter contre de potentiels microorganismes pathogènes (Mikelsaar and Zilmer 2009).

Deux études cliniques (en double aveugle contre placebo) incluant cette souche ont été réalisées respectivement chez des patients atteints de dermatite atopique modérée et des patients gravement malades ayant survécu à un accident vasculaire cérébral. La première étude a montré que la consommation de lait fermenté par la souche Me-3 pendant 3 mois par les patients permet une réduction importante du score de l'index SCORAD dans le groupe probiotique. Cet index combine des critères objectifs comme l'étendue et l'intensité des lésions et des critères subjectifs comme la perte de sommeil. Une quantité importante de fer oxydé (pro-oxydant) a été déterminée sur la peau de patients avant consommation du produit probiotique et ces valeurs ont par la suite diminué après le traitement probiotique. Enfin, chez

les patients recevant le produit probiotique, des mesures au niveau du sang et de la peau ont montré i) une diminution de la peroxydation lipidique, ii) une diminution du ratio GSSG/GSH et iii) l'augmentation du glutathion GSH (Mikelsaar and Zilmer 2009). La deuxième étude a montré que la consommation de capsules probiotiques contenant la souche Me-3 lyophilisée pendant 3 semaines par les patients ayant survécu à un accident vasculaire cérébral, a amélioré les indices biochimiques comme le GSSG ou le TAA. La consommation de la souche Me-3 a aussi induit une diminution significative des valeurs de marqueurs inflammatoires dosés chez ces patients, suggérant en plus de l'effet anti-oxydant de cette souche, des propriétés immuno-modulatrices (Mikelsaar and Zilmer 2009). En 2009, la caractérisation de cette souche a été jugée suffisante par un panel de l'EFSA lors d'un dépôt de demande d'allégation évaluant des propriétés anti-pathogènes de cette souche, mais le rapport ne mentionne pas ses propriétés anti-oxydantes. La conclusion de ce rapport est qu'une relation de cause à effet entre la consommation de la souche Me-3 et la diminution des microorganismes pathogènes dans le TD ne peut pas être établie (EFSA Panel on Dietetic Products 2011b).

Lors de notre étude, nous avons mis en place un essai *in vivo*, visant à confirmer les propriétés anti-oxydantes des souches VEL12211 et VEL12348 observées *in vitro* par des tests de résistance aux stress (H₂O₂, SB, pH, congélation) et de production de SOD et de CAT, dans un modèle de stress oxydant modéré induit chez la souris par l'administration de régime alimentaire carencé en sélénium et en vitamine E. Les résultats ont montré que les deux souches testées ont des propriétés moins prononcées que la souche témoin testée *L. fermentum* Me-3. Néanmoins, sur l'ensemble des paramètres testés, la souche VEL12211 montre de meilleurs résultats que la souche VEL12348.

Nous avons alors décidé de refaire l'essai dans les mêmes conditions, afin de confirmer les propriétés anti-oxydantes des souches VEL12211 et VEL12348 et de pouvoir choisir la meilleure. Cependant, nous avons inclus un nouveau marqueur à doser: le phosphatidylcholine hydroperoxyde (PCOOH) qui peut être mesuré dans le sang ou dans les tissus. Ce marqueur a récemment été conseillé par l'EFSA et permettrait de mesurer les dégâts sur la peroxydation des lipides (EFSA Panel on Dietetic Products 2011). Cet essai est en cours, et nous n'aurons pas les résultats avant le mois d'avril 2012.

L'hypothèse de départ selon laquelle une souche résistante à un stress oxydant, pourrait avoir des propriétés anti-oxydantes sera donc confirmée, si lors du prochain essai *in*

vivo la souche VEL12211, parmi les souches les plus résistantes à H₂O₂ et résistante aux SB, montre de meilleurs résultats que la souche VEL12348.

Il a été décrit, depuis quelques années une relation entre le stress oxydant et des pathologies de type MICI (Tuzun, Erdil et al. 2002; Lenoir, Rossary et al. 2011; Ozyilmaz, Yildirim et al. 2011; Almenier, Menshawy et al. 2012). Ces travaux pourraient s'appliquer à notre thématique de confirmation des effets anti-oxydants des souches VEL12211 et VEL12348, en étudiant l'apport de ces souches potentiellement anti-oxydantes sur des modèles murins d'inflammations intestinales, de type DSS ou TNBS précédemment décrits (Rochat, Bermudez-Humaran et al. 2007; Watterlot, Rochat et al. 2010). Ces modèles doivent générer des inflammations très modérées pour induire un état de stress oxydant et non d'inflammation prononcée.

Suite à nos travaux de criblage *in vitro* concernant l'identification de souches bactériennes anti-oxydantes, nous avons testé deux souches potentiellement anti-oxydantes *L. zeae* VEL12211 et *L. brevis* VEL12348 *in vivo* chez la souris afin d'étudier leurs propriétés anti-oxydantes. Le modèle de stress oxydant *in vivo* consiste à alimenter les souris par un régime carencé en sélénium et en vitamine E pendant 6 semaines, puis à leur administrer les bactéries quotidiennement pendant 4 semaines tout en continuant à les alimenter avec le régime carencé.

Les dosages de marqueurs tels que le KRL, le MDA ou le GSSG/GSH révèlent des résultats très proches pour les souches VEL12211 et VEL12348, avec un avantage pour la souche VEL12211.

Il nous a alors paru indispensable de refaire cet essai *in vivo*, en incluant de nouveaux marqueurs tels que les PCOOH, les lipoprotéines et l'activité GPx afin de confirmer les propriétés anti-oxydantes de la souche VEL12211. Cet essai est actuellement en cours.

La souche qui sera identifiée suite à cet essai, devrait être utilisée pour la commercialisation d'un produit fermenté. Une étude clinique en double aveugle contre placebo devra confirmer les effets anti-oxydants de cette souche chez l'homme.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Les BL regroupent une large variété de bactéries à Gram positif telles que les lactobacilles et les bifidobactéries, qui font partie intégrante du microbiote humain, mais aussi de nouveaux produits probiotiques. De par sa définition, une souche bactérienne probiotique est une bactérie vivante apportée par l'alimentation des consommateurs et qui doit exercer un effet positif sur sa santé. Les effets bénéfiques des souches probiotiques qui sont souche-dépendants, regroupent la lutte contre les microorganismes pathogènes, la colonisation du microbiote, mais aussi le maintien de l'homéostasie immunitaire. Ces bactéries ont d'autre part montré des effets positifs sur des pathologies inflammatoires comme la colite ulcéraire et la psoriasis, ainsi que les pathologies liées au stress oxydant.

Ces dernières années, des études sur ces bactéries ont montré une influence bénéfique sur les allergies et les infections virales. Les paramètres utilisés pour l'identification de nouvelles souches bactériennes probiotiques tiennent une part importante dans ces études et leurs choix doivent être basés sur des études robustes. De plus, les doses bactériennes utilisées lors des études doivent être compatibles avec une consommation ultérieure du produit probiotique par les consommateurs. Il n'est pas toujours facile de transposer les résultats observés chez la souris aux résultats observés chez l'homme parce que i) d'une part l'homme possède un régime alimentaire beaucoup plus varié que celui de la souris, avec une consommation importante de vitamines, de minéraux et de fibres qui peuvent potentialiser les effets des probiotiques et ii) que d'autre part, la transformation industrielle de la souche, ainsi que la matrice utilisée pour commercialiser le produit probiotique ne doivent pas modifier les propriétés des souches.

Au cours de notre étude, nous avons tout d'abord constitué une collection de bactéries, regroupant au total plus de 150 souches afin de maximiser nos chances d'identifier des bactéries probiotiques. Nous avons, par la suite, caractérisé ces souches pour leurs propriétés immuno-modulatrices, ainsi que leurs propriétés anti-oxydantes.

Afin de classer les souches selon leurs profils immuno-modulateurs (souches pro-inflammatoires, neutres et anti-inflammatoires), nous avons choisi i) de doser l'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire principalement sécrétée par la lignée épithéliale HT29 et ii) de doser les deux cytokines IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) et IL-12p70 (cytokine pro-inflammatoire) après co-incubation des bactéries avec les cellules sanguines PBMC. Les souches bactériennes sélectionnées ont été par la suite étudiées dans deux modèles *in vivo*

pour confirmer leurs propriétés immuno-modulatrices dans le cadre i) d'une infection par le virus de la grippe et ii) d'une inflammation intestinale induite par le DSS.

En parallèle à l'étude des propriétés immuno-modulatrices des souches *in vitro*, nous avons mis au point une technique multifactorielle et à haut débit pour l'étude de la résistance de ces souches aux stress *in vitro*. Ces travaux nous ont permis de mieux caractériser les souches immuno-modulatrices sélectionnées et de sélectionner des souches potentiellement anti-oxydantes *in vitro*.

Nos données expérimentales portant sur l'identification de souches bactériennes immuno-modulatrices démontrent clairement des effets positifs de l'administration orale de la souche *L. plantarum* CNRZ 1997 dans le cadre d'une infection virale par un virus de la grippe adapté aux souris en limitant la perte des poids des souris et en favorisant l'élimination du virus des poumons des souris après une infection virale avec 100 PFU. Cette souche présente *in vitro* un profil pro-inflammatoire avec une forte production d'IL-12p70, ainsi qu'une faible production d'IL-10. Un essai clinique en double aveugle avec le complément alimentaire fabriqué avec cette souche et un placebo est en cours d'étude par nos partenaires industriels.

Dans le modèle murin d'inflammation intestinale induite par le DSS à 3%, nous avons d'abord montré une tendance de la souche anti-inflammatoire *L. paracasei* VEL12195 à protéger les souris BALB/c. Malgré ces résultats préliminaires encourageants, les propriétés anti-inflammatoires de cette souche n'ont pas été confirmées lors d'un nouvel essai sur des souris C57BL/6 traitées avec une dose 2,5 % de DSS.

Afin d'étudier les propriétés anti-oxydantes des souches de la collection, après l'étude de la résistance des souches de la collection à des stress oxydants et aux SB, nous avons sélectionné les souches résistantes à la fois à H₂O₂ et aux SB. Ces souches ont été caractérisées plus finement *in vitro* par nos collègues du GPMA pour leurs propriétés anti-oxydantes *in vitro*. Les deux souches identifiées suite à ces travaux, ont été étudiées dans un modèle murin de stress oxydant modéré induit par la consommation de régime alimentaire carencé en sélénium et en vitamine E.

Cet essai *in vivo* a permis d'identifier une souche anti-oxydante *L. zeae* VEL12211. Afin de confirmer ces propriétés, nous avons entamé un nouvel essai chez la souris avec cette souche, mais aussi avec l'autre souche *L. brevis* VEL12348 testée dans le premier essai anti-oxydant. Cet essai est en cours, les mêmes paramètres biologiques seront analysés, avec en plus le dosage des PCOOH, des lipoprotéines et l'activité GPx.

Les 3 souches retenues suite à ce projet (ou en cours de confirmation), *L. plantarum* CNRZ 1997, *L. paracasei* VEL12195 et *L. zeae* VEL12211 ont été caractérisées morphologiquement, biochimiquement, et génétiquement. Le génome de la souche VEL12195 a été entièrement séquencé, ceux des autres souches le seront prochainement. Ces données permettront d'étayer plus tard le dépôt d'un dossier à l'EFSA.

Etant donné la législation européenne très stricte, sur la consommation et la dissémination des organismes génétiquement modifiés, les produits à base de souches probiotiques utilisés en alimentation humaine sont uniquement des souches naturelles. D'ici quelques années, nous verrons peut être des bactéries recombinantes génétiquement modifiées, mises sur le marché. Ces bactéries ne doivent pas posséder de résistance à un antibiotique, et les modifications génétiques qu'elles ont eues doivent être intégrées dans le chromosome. Ces bactéries recombinantes peuvent être des vecteurs pour délivrer au sein du TD des protéines d'intérêt thérapeutique, ou des bactéries rendues plus performantes pour résister au passage dans le TD. Peu d'études ont permis d'identifier les molécules responsables des effets probiotiques de certaines bactéries. Ces molécules, si elles sont mises sur le marché pharmaceutique, deviendront des concurrents redoutables aux probiotiques et entraîneraient probablement leur disparition du marché.

Il est certain qu'une meilleure compréhension des mécanismes d'action des probiotiques et de leurs effets chez l'hôte, ainsi qu'une caractérisation plus accrue des probiotiques, permettront une meilleure acceptation des probiotiques par les consommateurs. En effet, les consommateurs sont souvent méfiants face à des produits probiotiques vendus souvent chers et sans certitude scientifique de leurs effets bénéfiques chez l'homme.

Dans un cadre plus général, l'identification des molécules responsables des effets bénéfiques, impliqués dans les propriétés probiotiques des souches bactériennes, permettra aux scientifiques de mieux comprendre les mécanismes d'action des bactéries probiotiques, et offrira une nouvelle opportunité aux industriels qui pourront commercialiser des produits à base des molécules identifiées.

En conclusion, ce travail de thèse a mis en évidence une souche immuno-modulatrice, ainsi qu'une souche potentiellement anti-oxydante. Nos travaux apportent également des critères supplémentaires pour une sélection optimale des souches probiotiques pour de futures applications industrielles.

Comme perspectives à ce travail, nous tenterons d'identifier les mécanismes d'action de la souche immuno-modulatrice *L. plantarum* CNRZ 1997 et de la souche anti-oxydante *L. zea*e VEL12211, afin de mieux les caractériser en vue de l'obtention d'allégations par l'EFSA, permettant ainsi la commercialisation par nos partenaires industriels de produits probiotiques contenant ces bactéries en Europe.

BIBLIOGRAPHIE

- Abreu, M. T. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function." *Nat Rev Immunol* **10**(2): 131-44.
- Akdis, M., S. Burgler, et al. (2011). "Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases." *J Allergy Clin Immunol* **127**(3): 701-21 e1-70.
- Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." *Nat Immunol* **2**(8): 675-80.
- Almenier, H. A., H. H. Menshaw, et al. (2012). "Oxidative stress and inflammatory bowel disease." *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 1335-44.
- Arumugam, M., J. Raes, et al. (2011). "Enterotypes of the human gut microbiome." *Nature* **473**(7346): 174-80.
- Benov, L. and I. Fridovich (1999). "Why superoxide imposes an aromatic amino acid auxotrophy on *Escherichia coli*. The transketolase connection." *J Biol Chem* **274**(7): 4202-6.
- Bienenstock, J. and M. R. McDermott (2005). "Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues." *Immunol Rev* **206**: 22-31.
- Boge, T., M. Remigy, et al. (2009). "A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials." *Vaccine* **27**(41): 5677-84.
- Borchers, A. T., C. Selmi, et al. (2009). "Probiotics and immunity." *J Gastroenterol* **44**(1): 26-46.
- Bron, P. A., M. Marco, et al. (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**(23): 7829-35.
- Bron, P. A., P. van Baaren, et al. (2011). "Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa." *Nat Rev Microbiol* **10**(1): 66-78.
- Cario, E., G. Gerken, et al. (2007). "Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function." *Gastroenterology* **132**(4): 1359-74.
- Champagne, C. P., H. Gaudreau, et al. (1999). "Evaluation of yeast extracts as growth media supplements for lactococci and lactobacilli by using automated spectrophotometry." *J Gen Appl Microbiol* **45**(1): 17-21.
- Chang, J. H., Y. Y. Shim, et al. (2009). "Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi." *J Appl Microbiol* **109**(1): 220-30.
- Chapman, C. M., G. R. Gibson, et al. (2010). "Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains?" *Eur J Nutr* **50**(1): 1-17.
- Charteris, W. P., P. M. Kelly, et al. (1998). "Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract." *J Appl Microbiol* **84**(5): 759-68.
- Chen, L. L., X. H. Wang, et al. (2009). "Therapeutic effects of four strains of probiotics on experimental colitis in mice." *World J Gastroenterol* **15**(3): 321-7.
- Claes, I. J., S. Lebeer, et al. (2010). "Impact of lipoteichoic acid modification on the performance of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in experimental colitis." *Clin Exp Immunol* **162**(2): 306-14.
- Coudeyras, S. and C. Forestier (2010). "[Microbiota and probiotics: effects on human health]." *Can J Microbiol* **56**(8): 611-50.
- Csencsits, K. L., M. A. Jutila, et al. (1999). "Nasal-associated lymphoid tissue: phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in naive lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site." *J Immunol* **163**(3): 1382-9.
- Cukrowska, B., I. Motyl, et al. (2009). "Probiotic *Lactobacillus* strains: in vitro and in vivo studies." *Folia Microbiol (Praha)* **54**(6): 533-7.
- Czerucka, D., T. Piche, et al. (2007). "Review article: yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii*." *Aliment Pharmacol Ther* **26**(6): 767-78.
- de Vrese, M., P. Winkler, et al. (2006). "Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial." *Vaccine* **24**(44-46): 6670-4.

- Delcenserie, V., D. Martel, et al. (2008). "Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract." *Curr Issues Mol Biol* **10**(1-2): 37-54.
- Dinareello, C. A. (2007). "Historical insights into cytokines." *Eur J Immunol* **37** Suppl 1: S34-45.
- Dong, H., I. Rowland, et al. (2011). "Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro." *Br J Nutr*: 1-12.
- Drouault-Holowacz, S., B. Foligne, et al. (2006). "Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolerance: in vitro and in vivo considerations." *Clin Nutr* **25**(6): 994-1003.
- Dunne, C., L. O'Mahony, et al. (2001). "In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings." *Am J Clin Nutr* **73**(2 Suppl): 386S-392S.
- EFSA (2007). "Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA." *The EFSA Journal* **5**87: 1-16.
- EFSA Panel on Dietetic Products, N. a. A. (2010). "Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006." *EFSA Journal* **8**(10): 1763.
- EFSA Panel on Dietetic Products, N. a. A. (2011). "Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health." *EFSA Journal* **9**(12): 2474.
- EFSA Panel on Dietetic Products, N. a. A. (2011b). "Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to *Lactobacillus fermentum* ME-3 and decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 3025) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006." *EFSA Journal* **9**(4): 2025.
- Ejtahed, H. S., J. Mohtadi-Nia, et al. (2011). "Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients." *Nutrition*.
- Eliasson, M. and A. Egesten (2008). "Antibacterial chemokines--actors in both innate and adaptive immunity." *Contrib Microbiol* **15**: 101-17.
- Emerit, J., S. Pelletier, et al. (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: 563-9.
- Farr, S. B. and T. Kogoma (1991). "Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." *Microbiol Rev* **55**(4): 561-85.
- Flint, D. H., J. F. Tuminello, et al. (1993). "The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide." *J Biol Chem* **268**(30): 22369-76.
- Foligne, B., J. Dewulf, et al. (2010). "Probiotic yeasts: anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice." *World J Gastroenterol* **16**(17): 2134-45.
- Foligne, B., S. Nutten, et al. (2007). "Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria." *World J Gastroenterol* **13**(2): 236-43.
- Forsythe, P. and J. Bienenstock (2010). "Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria." *Immunol Invest* **39**(4-5): 429-48.
- Frantz, S., K. A. Vincent, et al. (2005). "Innate immunity and angiogenesis." *Circ Res* **96**(1): 15-26.
- Fukushima, Y., S. Miyaguchi, et al. (2007). "Improvement of nutritional status and incidence of infection in hospitalised, enterally fed elderly by feeding of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533)." *Br J Nutr* **98**(5): 969-77.
- Galdeano, C. M., A. de Moreno de LeBlanc, et al. (2007). "Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria." *Clin Vaccine Immunol* **14**(5): 485-92.
- Gareau, M. G., P. M. Sherman, et al. (2010). "Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**(9): 503-14.
- Garrett, W. S., J. I. Gordon, et al. (2010). "Homeostasis and inflammation in the intestine." *Cell* **140**(6): 859-70.
- Geier, M. S., R. N. Butler, et al. (2007). "Lactobacillus fermentum BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats." *Int J Food Microbiol* **114**(3): 267-74.

- Gerard, P., P. Lepercq, et al. (2007). "Bacteroides sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces." *Appl Environ Microbiol* **73**(18): 5742-9.
- Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." *J Nutr* **125**(6): 1401-12.
- Gionchetti, P., F. Rizzello, et al. (2000). "Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial." *Gastroenterology* **119**(2): 305-9.
- Giovannini, M., C. Agostoni, et al. (2007). "A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing Lactobacillus casei in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis." *Pediatr Res* **62**(2): 215-20.
- Goel, A., A. Mittal, et al. (2009). "In vivo effects of mesalazine or E. coli Nissle 1917 on microsatellite instability in ulcerative colitis." *Aliment Pharmacol Ther* **30**(6): 634-42.
- Gorbach, S. L. (2002). "Probiotics in the third millennium." *Dig Liver Dis* **34** Suppl 2: S2-7.
- Grabig, A., D. Paclik, et al. (2006). "Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways." *Infect Immun* **74**(7): 4075-82.
- Griffiths, H. R., L. Moller, et al. (2002). "Biomarkers." *Mol Aspects Med* **23**(1-3): 101-208.
- Grimoud, J., H. Durand, et al. (2010). "In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics." *Anaerobe* **16**(5): 493-500.
- Grimoud, J., H. Durand, et al. (2010). "In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects." *Int J Food Microbiol* **144**(1): 42-50.
- Guillemard, E., F. Tondu, et al. (2010). "Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic Lactobacillus casei DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial." *Br J Nutr* **103**(1): 58-68.
- Guo, X. H., J. M. Kim, et al. (2010). "Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties." *Anaerobe* **16**(4): 321-6.
- Han, W. and J. Fioramonti (2008). "Anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria producing superoxide dismutase." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(1): G353; author reply G354.
- Harata, G., F. He, et al. (2011). "Intranasal administration of Lactobacillus rhamnosus GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses." *Lett Appl Microbiol* **50**(6): 597-602.
- Hatakka, K., E. Savilahti, et al. (2001). "Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial." *BMJ* **322**(7298): 1327.
- Hathout, A. S., S. R. Mohamed, et al. (2011). "Ability of Lactobacillus casei and Lactobacillus reuteri to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet." *Toxicol* **58**(2): 179-86.
- Hedin, C., K. Whelan, et al. (2007). "Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials." *Proc Nutr Soc* **66**(3): 307-15.
- Hegazy, S. K. and M. M. El-Bedewy (2010). "Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis." *World J Gastroenterol* **16**(33): 4145-51.
- Hori, T., J. Kiyoshima, et al. (2002). "Augmentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed Lactobacillus casei strain Shirota." *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(1): 105-8.
- Isolauri, E., S. Salminen, et al. (2004). "Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**(2): 299-313.
- Jacobsen, C. N., V. Rosenfeldt Nielsen, et al. (1999). "Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans." *Appl Environ Microbiol* **65**(11): 4949-56.
- Kaci, G., O. Lakhdari, et al. (2011). "Inhibition of the NF-kappaB pathway in human intestinal epithelial cells by commensal Streptococcus salivarius." *Appl Environ Microbiol* **77**(13): 4681-4.

- Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, et al. (2007). "Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease." *Immunity* **27**(4): 549-59.
- Karchev, T. and P. Kabakchiev (1984). "M-cells in the epithelium of the nasopharyngeal tonsil." *Rhinology* **22**(3): 201-10.
- Kawase, M., F. He, et al. (2009). "Oral administration of lactobacilli from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection." *Lett Appl Microbiol* **51**(1): 6-10.
- Kawase, M., F. He, et al. (2011). "Heat-killed *Lactobacillus gasseri* TMC0356 protects mice against influenza virus infection by stimulating gut and respiratory immune responses." *FEMS Immunol Med Microbiol*.
- Kawashima, T., K. Hayashi, et al. (2011). "Lactobacillus plantarum strain YU from fermented foods activates Th1 and protective immune responses." *Int Immunopharmacol* **11**(12): 2017-24.
- Kelly, D., J. I. Campbell, et al. (2004). "Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA." *Nat Immunol* **5**(1): 104-12.
- Khani, S., H. M. Hosseini, et al. (2012). "Probiotics as an Alternative Strategy for Prevention and Treatment of Human Diseases: A Review." *Inflamm Allergy Drug Targets*.
- Kimoto, H., K. Mizumachi, et al. (2004). "New Lactococcus strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response." *Microbiol Immunol* **48**(2): 75-82.
- Kingsley C. Anukam, G. R. (2007). "Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation." *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Kiyono, H. and S. Fukuyama (2004). "NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity." *Nat Rev Immunol* **4**(9): 699-710.
- Klein, M., M. E. Sanders, et al. (2010). "Probiotics: from bench to market." *Ann N Y Acad Sci* **1212 Suppl 1**: E1-14.
- Kobayashi, N., T. Saito, et al. (2011). "Oral administration of heat-killed *Lactobacillus pentosus* strain b240 augments protection against influenza virus infection in mice." *Int Immunopharmacol* **11**(2): 199-203.
- Kohen, R. and A. Nyska (2002). "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." *Toxicol Pathol* **30**(6): 620-50.
- Koll, P., R. Mandar, et al. (2010). "Screening and evaluation of human intestinal lactobacilli for the development of novel gastrointestinal probiotics." *Curr Microbiol* **61**(6): 560-6.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." *Annu Rev Immunol* **27**: 485-517.
- Kruis, W., S. Chrubasik, et al. (2011). "A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome." *Int J Colorectal Dis*.
- Kruis, W., P. Fric, et al. (2004). "Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine." *Gut* **53**(11): 1617-23.
- Kullisaar, T., E. Songisepp, et al. (2003). "Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects." *Br J Nutr* **90**(2): 449-56.
- Kullisaar, T., M. Zilmer, et al. (2002). "Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics." *Int J Food Microbiol* **72**(3): 215-24.
- Kushner, I. and D. L. Rzewnicki (1994). "The acute phase response: general aspects." *Baillieres Clin Rheumatol* **8**(3): 513-30.
- Le Goffic, R., E. Bouguyon, et al. (2010). "Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells." *J Immunol* **185**(8): 4812-23.
- Lee, H., H. Yoon, et al. (2011). "Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi." *Int J Food Microbiol* **145**(1): 155-61.
- Lee, H. S., S. Y. Han, et al. (2008). "Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice." *Int Immunopharmacol* **8**(4): 574-80.

- Lenoir, L., A. Rossary, et al. (2011). "Lemon verbena infusion consumption attenuates oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat." *Dig Dis Sci* **56**(12): 3534-45.
- Lilly DM, S. R. (1965). "Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. ." *Science* **147**(3659): 747-8.
- Lin, M. Y. and C. L. Yen (1999). "Antioxidative ability of lactic acid bacteria." *J Agric Food Chem* **47**(4): 1460-6.
- Littman, D. R. and A. Y. Rudensky (2010). "Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation." *Cell* **140**(6): 845-58.
- Ma, E. L., Y. J. Choi, et al. (2010). "The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition." *Int J Cancer* **127**(4): 780-90.
- Machlin, L. J. and A. Bendich (1987). "Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients." *FASEB J* **1**(6): 441-5.
- Macho Fernandez, E., V. Valenti, et al. (2011). "Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide." *Gut* **60**(8): 1050-9.
- Maeda, N., R. Nakamura, et al. (2009). "Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice." *Int Immunopharmacol* **9**(9): 1122-5.
- Magalhaes, J. G., I. Tattoli, et al. (2007). "The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens." *Semin Immunol* **19**(2): 106-15.
- Martarelli, D., M. C. Verdenelli, et al. (2011). "Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training." *Curr Microbiol* **62**(6): 1689-96.
- Masood, M. I., M. I. Qadir, et al. (2011). "Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings." *Crit Rev Microbiol* **37**(1): 91-8.
- Matsumoto, S., T. Hara, 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**(3): 417-26.
- Mazur, A., F. Nassir, et al. (1996). "Diets deficient in selenium and vitamin E affect plasma lipoprotein and apolipoprotein concentrations in the rat." *Br J Nutr* **76**(6): 899-907.
- McFarland, L. V. (2010). "Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients." *World J Gastroenterol* **16**(18): 2202-22.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." *Nature* **449**(7164): 819-26.
- Mennigen, R., K. Nolte, et al. (2009). "Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**(5): G1140-9.
- Mikelsaar, M. and M. Zilmer (2009). "Lactobacillus fermentum ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic." *Microb Ecol Health Dis* **21**(1): 1-27.
- Mileti, E., G. Matteoli, et al. (2009). "Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy." *PLoS One* **4**(9): e7056.
- Miyauchi, E., H. Morita, et al. (2009). "Lactobacillus rhamnosus alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase in vivo." *J Dairy Sci* **92**(6): 2400-8.
- Muller, K. H., L. Kakkola, et al. (2011). "Emerging cellular targets for influenza antiviral agents." *Trends Pharmacol Sci*.
- Murosaki, S., Y. Yamamoto, et al. (1998). "Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice." *J Allergy Clin Immunol* **102**(1): 57-64.

- Nagai, T., S. Makino, et al. (2011). "Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice." Int Immunopharmacol **11**(12): 2246-50.
- Nanda Kumar, N. S., R. Balamurugan, et al. (2008). "Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulfate." J Gastroenterol Hepatol **23**(12): 1834-9.
- Niwa, Y., K. Somiya, et al. (1985). "Effect of liposomal-encapsulated superoxide dismutase on active oxygen-related human disorders. A preliminary study." Free Radic Res Commun **1**(2): 137-53.
- O'Hara, A. M., P. O'Regan, et al. (2006). "Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*." Immunology **118**(2): 202-15.
- O'Hara, A. M. and F. Shanahan (2006). "The gut flora as a forgotten organ." EMBO Rep **7**(7): 688-93.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). "Mechanisms of probiotic actions - A review." Int J Med Microbiol **300**(1): 57-62.
- Okayasu, I., S. Hatakeyama, et al. (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." Gastroenterology **98**(3): 694-702.
- Olivares, M., M. P. Diaz-Ropero, et al. (2007). "Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination." Nutrition **23**(3): 254-60.
- Ozyilmaz, E., B. Yildirim, et al. (2011). "Is there Any Link Between Oxidative Stress and Lung Involvement due to Inflammatory Bowel Disease: An Experimental Study." Hepatogastroenterology **58**(112): 1898-903.
- Pagnini, C., R. Saeed, et al. (2010). "Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 454-9.
- Pastore, A., G. Federici, et al. (2003). "Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification." Clin Chim Acta **333**(1): 19-39.
- Perez-Cano, F. J., H. Dong, et al. (2010). "In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk." Immunobiology **215**(12): 996-1004.
- Petrof, E. O., K. Kojima, et al. (2004). "Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition." Gastroenterology **127**(5): 1474-87.
- Pham, L. C., M. A. Hoogenkamp, et al. (2010). "Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on saliva-derived microcosms." Arch Oral Biol **56**(2): 136-47.
- Preidis, G. A. and J. Versalovic (2009). "Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era." Gastroenterology **136**(6): 2015-31.
- Preising, J., D. Philippe, et al. (2010). "Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis." Appl Environ Microbiol **76**(9): 3048-51.
- Prost, M. (1992). "Process for the determination by means of free radicals of the antioxidant properties of a living organism or potentially aggressive agents." US patent 5,135,850.
- Rachmilewitz, D., K. Katakura, et al. (2004). "Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis." Gastroenterology **126**(2): 520-8.
- Rafter, J., M. Bennett, et al. (2007). "Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients." Am J Clin Nutr **85**(2): 488-96.
- Rangel-Moreno, J., D. Carragher, et al. (2007). "Role of lymphotoxin and homeostatic chemokines in the development and function of local lymphoid tissues in the respiratory tract." Inmunologia **26**(1): 13-28.
- Rigaux, P., C. Daniel, et al. (2009). "Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy." Allergy **64**(3): 406-14.

- Rochat, T., L. Bermudez-Humaran, et al. (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.
- Rochat, T., J. J. Gratadoux, et al. (2005). "Lactococcus lactis SpOx spontaneous mutants: a family of oxidative-stress-resistant dairy strains." Appl Environ Microbiol **71**(5): 2782-8.
- Round, J. L. and S. K. Mazmanian (2009). "The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease." Nat Rev Immunol **9**(5): 313-23.
- Sancho, E., E. Batlle, et al. (2004). "Signaling pathways in intestinal development and cancer." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 695-723.
- Sanders, M. E., L. M. Akkermans, et al. (2010). "Safety assessment of probiotics for human use." Gut Microbes **1**(3): 164-85.
- Santos Rocha, C., O. Lakhdari, et al. (2011). "Anti-inflammatory properties of dairy lactobacilli." Inflamm Bowel Dis.
- Sanz, Y. and G. De Palma (2009). "Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function." Int Rev Immunol **28**(6): 397-413.
- Saraiva, M. and A. O'Garra (2010). "The regulation of IL-10 production by immune cells." Nat Rev Immunol **10**(3): 170-81.
- Sazawal, S., G. Hiremath, et al. (2006). "Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials." Lancet Infect Dis **6**(6): 374-82.
- Schotte, L., L. Steidler, et al. (2000). "Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*." Enzyme Microb Technol **27**(10): 761-765.
- Schultz, M., U. G. Strauch, 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**(2): 372-8.
- Shalini, S. and M. P. Bansal (2007). "Alterations in selenium status influences reproductive potential of male mice by modulation of transcription factor NFkappaB." Biomaterials **20**(1): 49-59.
- Sokol, H., B. Pigneur, 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**(43): 16731-6.
- Songisepp, E., J. Kals, et al. (2005). "Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers." Nutr J **4**: 22.
- Storz, G. and J. A. Imlay (1999). "Oxidative stress." Curr Opin Microbiol **2**(2): 188-94.
- Takaoka, A. and H. Yanai (2006). "Interferon signalling network in innate defence." Cell Microbiol **8**(6): 907-22.
- Takeda, K. and S. Akira (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol **16**(1): 3-9.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.
- Takeda, S., M. Takeshita, et al. (2011). "Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products against influenza infection in mice: Alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity." Int Immunopharmacol **11**(12): 1976-83.
- Truusalu, K., R. H. Mikelsaar, et al. (2008). "Eradication of *Salmonella Typhimurium* infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 and ofloxacin." BMC Microbiol **8**: 132.
- Tutykhina, I. L., D. Y. Logunov, et al. (2011). "Development of adenoviral vector-based mucosal vaccine against influenza." J Mol Med (Berl) **89**(4): 331-41.
- Tuzun, A., A. Erdil, et al. (2002). "Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease." Clin Biochem **35**(7): 569-72.
- Ursini, F., M. Maiorino, et al. (1995). "Diversity of glutathione peroxidases." Methods Enzymol **252**: 38-53.
- Valko, M., M. Izakovic, et al. (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." Mol Cell Biochem **266**(1-2): 37-56.

- van de Guchte, M., P. Serror, et al. (2002). "Stress responses in lactic acid bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **82**(1-4): 187-216.
- van der Aa, L. B., W. M. van Aalderen, et al. (2010). "Synbiotics prevent asthma-like symptoms in infants with atopic dermatitis." Allergy **66**(2): 170-7.
- Vasiljevic, T. a. S. N. P. (2007). "Probiotics-From Metchnikoff to bioactives." International Dairy Journal **18**: 714- 728.
- Wakefield, P. E., W. D. James, et al. (1990). "Colony-stimulating factors." J Am Acad Dermatol **23**(5 Pt 1): 903-12.
- Wang, B., J. Li, et al. (2009). "Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization and immune response by Lactobacillus plantarum L2 in the rat gastrointestinal tract." Int J Food Microbiol **132**(1): 59-66.
- Wang, Y. C., R. C. Yu, et al. (2006). "Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria." Food Microbiol **23**(2): 128-35.
- Watterlot, L., T. Rochat, et al. (2010). "Intragastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant Lactobacillus casei BL23 strain attenuates DSS colitis in mice." Int J Food Microbiol **144**(1): 35-41.
- Wells, J. M. (2011). "Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli." Microb Cell Fact **10 Suppl 1**(30): S17.
- West, N. P., D. B. Pyne, et al. (2009). "Probiotics, immunity and exercise: a review." Exerc Immunol Rev **15**: 107-26.
- Wolowczuk, I., C. Verwaerde, et al. (2008). "Feeding our immune system: Impact on metabolism." Clinical & Developmental Immunology: 1-19.
- Wu, X., B. A. Vallance, et al. (2008). "Saccharomyces boulardii ameliorates Citrobacter rodentium-induced colitis through actions on bacterial virulence factors." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(1): G295-306.
- Yang, J. G., K. E. Hill, et al. (1989). "Dietary selenium intake controls rat plasma selenoprotein P concentration." J Nutr **119**(7): 1010-2.
- Yasui, H., J. Kiyoshima, et al. (2004). "Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed Lactobacillus casei Shirota." Clin Diagn Lab Immunol **11**(4): 675-9.
- Yasui, H., N. Nagaoka, et al. (1994). "Augmentation of anti-influenza virus hemagglutinin antibody production by Peyer's patch cells with Bifidobacterium breve YIT4064." Clin Diagn Lab Immunol **1**(2): 244-6.
- Zakostelska, Z., M. Kverka, et al. (2011). "Lysate of Probiotic Lactobacillus casei DN-114 001 Ameliorates Colitis by Strengthening the Gut Barrier Function and Changing the Gut Microenvironment." PLoS One **6**(11): e27961.
- Zelko, I. N., T. J. Marianti, et al. (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**(3): 337-49.

ANNEXES

Annexe 1 : Souches de la collection bactérienne constituée

Numéro	DESIGNATION	Numéro	DESIGNATION
VEL 12191	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	VEL 12367	<i>Lactobacillus vaginalis</i> LVG01
VEL 12192	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	VEL 12377	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ 327
VEL 12193	<i>Lactobacillus helveticus</i>	VEL 12378	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ 333
VEL 12194	<i>Lactobacillus paracasei</i>	VEL 12379	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ 700
VEL12195	<i>Lactobacillus paracasei</i>	VEL 12380	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> GM 327g
VEL 12196	<i>Lactobacillus plantarum</i>	VEL 12381	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> GM 1055
VEL 12197	<i>Lactobacillus plantarum</i>	VEL 12382	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> GM11842
VEL 12198	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	VEL 12383	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> GM 226
VEL 12199	<i>Lactobacillus pentosus</i>	VEL 12384	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> GM 449
VEL 12200	<i>Lactobacillus pentosus</i>	VEL 12385	<i>Lactobacillus fermentum</i> Me-3
VEL 12201	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	VEL 12242	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
VEL 12202	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	VEL 12243	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
VEL 12203	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	VEL 12244	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12204	<i>Lactobacillus casei</i>	VEL12245	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12205	<i>Lactobacillus casei</i>	VEL 12246	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12206	<i>Lactobacillus casei</i>	VEL 12247	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12207	<i>Lactobacillus casei</i>	VEL 12248	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12208	<i>Lactobacillus brevis</i>	VEL 12249	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12209	<i>Lactobacillus fermentum</i>	VEL 12250	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12210	<i>Lactobacillus fermentum</i>	VEL 12251	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL12211	<i>Lactobacillus zeae</i>	VEL 12252	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
VEL 12212	<i>Lactobacillus zeae</i>	VEL 12253	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12213	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	VEL 12254	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12214	<i>Lactobacillus crispatus</i>	VEL 12255	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
VEL 12215	<i>Lactobacillus crispatus</i>	VEL 12256	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
VEL 12216	<i>Lactobacillus crispatus</i>	VEL 12257	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12217	<i>Lactobacillus gasseri</i>	VEL 12258	<i>Lactococcus garvieae</i>
VEL 12218	<i>Lactobacillus gasseri</i>	VEL 12259	<i>Lactococcus plantarum</i>
VEL 12219	<i>Lactobacillus salivarius</i>	VEL 12260	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>

VEL 12220	<i>Lactobacillus salivarius</i>	VEL 12261	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
VEL 12221	<i>Lactobacillus sakei</i>	VEL 12262	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12222	<i>Lactobacillus reuteri</i>	VEL 12263	<i>Lactococcus lactis hordinae</i>
VEL 12223	<i>Lactobacillus reuteri</i>	VEL 12264	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
VEL 12224	<i>Lactobacillus curvatus</i>	VEL 12265	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
VEL 12225	<i>Lactobacillus curvatus</i>	VEL 12266	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12226	<i>Lactobacillus curvatus</i>	VEL 12267	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
VEL 12227	<i>Lactobacillus delbrueckii sp lactis</i>	J60011	<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> NCDO712
VEL 12228	<i>Lactobacillus delbrueckii sp lactis</i>	Spox K	<i>Spontaneous mutant Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> NCDO712
VEL 12229	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MG1363	<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> NCDO712
VEL 12230	<i>Lactobacillus helveticus</i>	VEL 12347	<i>Lactococcus lactis</i> SL106
VEL 12231	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	VEL 12375	<i>Lactococcus lactis</i> TIL46
VEL 12232	<i>Lactobacillus brevis</i>	VEL 12268	<i>Bifidobacterium longum</i>
VEL 12233	<i>Lactobacillus lactis</i> Lpc37	VEL 12269	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
VEL 12234	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	VEL12270	<i>Bifidobacterium longum</i>
VEL 12235	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	VEL 12271	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
VEL 12236	<i>Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus</i>	VEL 12272	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
VEL12237	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	VEL 12273	<i>Bifidobacterium longum</i>
VEL12238	<i>Lactobacillus plantarum</i>	VEL 12274	<i>Bifidobacterium longum</i>
VEL 12239	<i>Lactobacillus plantarum</i>	VEL 12275	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
VEL 12240	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	VEL 12276	<i>Bifidobacterium breve</i>
VEL 12241	<i>Lactobacillus plantarum</i>	VEL 12277	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
VEL 11757	<i>Lactobacillus casei</i> BL23 MnKat-	VEL 12328 (B88)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 11758	<i>Lactobacillus casei</i> BL23 MnKat+	VEL 12329 (V14)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 11685	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8826	VEL 12330 (V18)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12085	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	VEL 12331 (V19)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12079	<i>Lactobacillus casei</i> DN 114001	VEL 12332 (V22)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12093	<i>Lactobacillus salivarius</i> Ls33	VEL 12333 (V23)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12016	<i>Lactobacillus casei</i> BL23	VEL 12334 (L12)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12374	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB340	VEL 12335 (L19)	<i>Bifidobacterium angulatum</i>
VEL12348	<i>Lactobacillus brevis</i> LBR01	VEL 12336 (L21)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
VEL 12349	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB04	VEL 12337 (L24)	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
VEL 12350	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB08	VEL 13385 (L42)	<i>Bifidobacterium longum</i>

VEL 12351	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB13	VEL 12338 (L49)	<i>Bifidobacterium longum sub animalis</i>
VEL 12352	<i>Lactobacillus crispatus</i> LCR07	VEL 12339 (L50)	<i>Bifidobacterium angulatum</i>
VEL 12353	<i>Lactobacillus crispatus</i> LCR11	VEL 12340 (L74)	<i>Bifidobacterium infantis</i>
VEL 12354	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF04	VEL 12341 (L75)	<i>Bifidobacterium animalis</i>
VEL 12355	<i>Lactobacillus gasseri</i> LG11	VEL 12342 (A3)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12356	<i>Lactobacillus helveticus</i> LH37	VEL 12343 (B12)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12357	<i>Lactobacillus lactis</i> LL01	VEL 12344 (D9)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12358	<i>Lactobacillus lactis</i> LL10	VEL 12345 (E12)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12359	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP22	VEL 12346 (H11)	<i>Bifidobacterium</i> isolé de fécès d'adulte sain
VEL 12360	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> LPP01	VEL 12376	<i>Bifidobacterium bifidum</i> CIP 56.7 ATCC 29251
VEL 12361	<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC41	VEL 12368	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST13
VEL 12362	<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC42	VEL 12369	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST14
VEL 12363	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LRH04	VEL 12370	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PP02
VEL 12364	<i>Lactobacillus salivarius</i> LS11	VEL 12371	<i>Pediococcus acidilactici</i> PA09
VEL 12365	<i>Lactobacillus salivarius</i> LS12	VEL 12372	<i>Streptococcus thermophilus</i> TA60
VEL 12366	<i>Lactobacillus sakei</i> LSK05	VEL 12373	<i>Bacillus subtilis</i> NATTO
VEL 12386	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG	VEL 12387	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> GM 449g

Annexe 2 : Composition du régime AIN-93M carencé ou non

Eléments du régime	Composition en pourcentage
Cellulose Durieux	5
Caséine HCl	14
L Cystine labo	0,18
Composé minéral AIN93M	3,5
Composé vitaminique AIN93Vx	1
Choline bitartrate	0,25
TBHQ	0,0008
Maltodextrine	15,5
Amidon de maïs	46,5692
Sucre semoule	10
Huile de soja	4

Composé minéral AIN93M	Composition en pourcentage
Potassium dihydrogénophosphate (KH_2PO_4)	25
Calcium carbonate (CaCO_3)	35,7
Sodium chlorure (sel) (NaCl)	7,4
Magnésium oxyde lourd (MgO)	2,4
Ammonium heptamolybdate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4 \text{H}_2\text{O}$)	0,000795
Sodium sélénite (Na_2SeO_3)	0,001025
Sodium fluorure (NaF)	0,00635
Chrome Potassium sulfate ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2, 12 \text{H}_2\text{O}$)	0,0275
Sodium métasilicate ($\text{Na}_2\text{SiO}_3, 9\text{H}_2\text{O}$)	0,145
Nickel carbonate ($\text{NiCO}_3, 4\text{H}_2\text{O}$)	0,00318
Acide Orthoborique (H_2BO_3)	0,00815
Lithium chlorure (LiCl)	0,00174
Ammonium Métavanadate (NH_4VO_3)	0,00066
Manganèse carbonate (MnCO_3)	0,063
Zinc carbonate (ZnCO_3)	0,165
tri-potassium citrate ($\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7, \text{H}_2\text{O}$)	2,8
Fer citrate ammoniacal	0,606
Potassium iodate (KIO_3)	0,001
Potassium sulfate (K_2SO_4)	4,66
Cuivre carbonate ($\text{CuCO}_3, \text{Cu}(\text{OH})_2$)	0,03
Sucre cristallisé	20,9806

Composés vitaminiques AIN93Vx	Composition en pourcentage
Palmitate de Vitamine A 267 000UI/g (A)	0,15
Chlorhydrate de Thiamine à 100% (B1)	0,06
Riboflavine à 100% (B2)	0,06
Acide Nicotinique à 100% (B3 ou PP)	0,3
D. Pantothénate de Calcium à 98% (B5)	0,16
Chlorhydrate de Pyrydoxine à 100% (B6)	0,07
D. Biotine 2% (B8)	0,1
Acide folique à 100% (B9)	0,02
Cyanocobalamine 1g/kg (B12)	0,25
Vitamine D3 (400,000 UI/g)	0,025
Vitamine E à 50%	1,5
Phylloquinone à 5% (K1)	0,15
Sucre Cristallisé	97,155

Annexe 3 : Publication (soumission dans Applied and Environmental Microbiology)

Identification of novel probiotic immunomodulatory strains using large scale screening of lactic acid bacteria: validation in a murine model of influenza virus infection

Noura Kechaou^{1,2}, Florian Chain^{1,2}, Jean-Jacques Gratadoux^{1,2}, Sebastien Blugeon^{1,2}, Nicolas Bertho³, Christophe Chevalier³, Ronan Le Goffic³, Pascal Molimard⁴, Jean Marc Chatel^{1,2}, Philippe Langella^{1,2} and Luis G. Bermúdez-Humarán^{1,2,*}

¹ INRA, UMR 1319 Micalis, F-78350 Jouy –en-Josas, France;

² AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy –en-Josas, France ;

³ Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, UR892, 78352 Jouy-en-Josas, France ;

⁴ Merck Médication Familiale, BP 77035, 21070 Dijon, France.

* Corresponding author: Luis G. Bermúdez-Humarán

Tel: 33 1 34 65 24 63

Fax: 33 1 34 65 24 62

Email: luis.bermudez@jouy.inra.fr

Key words: Probiotics, lactic acid bacteria, immunomodulation, large scale screening, influenza virus infection

ABSTRACT

Host immunomodulation is one of the most commonly supposed beneficial effects of the consumption of probiotics. Most actual probiotics belong to Gram-positive lactic acid bacteria (LAB). In order to identify novel probiotic strains, we developed in this study a large scale screening of LAB. For this, 158 Gram positive bacteria, including a majority of LAB, was screened for their immunomodulatory effects using two different cellular models: a human intestinal epithelial cell line (HT-29) and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). *In vitro* immunomodulation was determined by measuring either pro- (IL-8 and IL-12p70) or anti-inflammatory (IL-10) cytokines released by these cells after co-incubation with the different bacteria. The most responsive strains to both models were then tested *in vivo* in a murine model of influenza virus infection to determine their protective effects. Daily intragastric administration during 10 days before and 10 days after viral challenge with influenza virus IAV H1N1 PR8/34 of one potentially probiotic strain *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1997 revealed a considerably improvement in mice health by significantly reducing the loss of body weight starting from day 6 post infection, alleviating clinical symptoms and inhibiting the virus proliferation in lungs relative to control group findings (76% against 57% between day 10 and 14 post infection). These results validate the prediction of *in vivo* immunomodulatory properties of LAB based on a cytokine profile established *in vitro*. In conclusion, we have developed a robust approach which allows the screening of a large number of bacteria for their immunomodulatory properties. We thus identified a novel probiotic strain (isolated from yack milk) *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1997 acting against influenza virus infection in mice.

INTRODUCTION

Probiotics are defined as living microorganisms, which upon ingestion, exert health benefits beyond inherent basic nutrition (Kingsley C. Anukam 2007; Vasiljevic 2007; Shida and Nanno 2008; Forsythe and Bienenstock 2010; Bron, van Baarlen et al. 2011). Their use is more and more popular for both prevention and treatment of a number of human diseases (Sazawal, Hiremath et al. 2006; Hedin, Whelan et al. 2007; Rafter, Bennett et al. 2007; Rigaux, Daniel et al. 2009; Guillemard, Tondu et al. 2010; Hegazy and El-Bedewy 2010; Pagnini, Saeed et al. 2010; Pham, Hoogenkamp et al. 2010; van der Aa, van Aalderen et al. 2010). Most probiotic microorganisms belong to lactic acid bacteria (LAB). However, not all probiotics display the same properties and a careful selection of specific strains based on their claimed beneficial effects is required. For example, comparison of 3 different *Lactobacillus* strains, *L. plantarum* NCIMB8826, *L. rhamnosus* LGG and *L. paracasei* B21060, revealed that the first two strains exacerbate the development of a Dextran Sulfate Sodium (DSS)-induced colitis in mice causing their death, while *L. paracasei* strain was protective (Mileti, Matteoli et al. 2009).

Although several criteria have been proposed to determine novel probiotic strains, selection of potential candidates generally starts at the preclinical level (*i.e.* animal trials) and includes evaluation of both safety and potential efficacy (Sorokulova 2008). The effect of probiotics is greatly influenced by their functional properties, such as antimicrobial activity, the persistence in the gut and the immunomodulatory properties (Annuk, Shchepetova et al. 2003; Foligne, Nutten et al. 2007). *In vitro* cellular models could be used to test the pro- or anti-inflammatory capacities of a set of bacteria, before validation in *in vivo* experiments. Indeed, these *in vivo* experiments are expensive and time consuming and require approval by ethical committees. Therefore, the development of new reliable *in vitro* models for the selection of promising probiotic strains is highly needed.

Over the last five years, the interest in the immunomodulatory properties of LAB strains has significantly increased. A wide variety of strain-dependent properties have been reported (Dunne, O'Mahony et al. 2001; Foligne, Nutten et al. 2007; Grimoud, Durand et al. 2010; Guo, Kim et al. 2010; Snel, Vissers et al. 2010; Kaci, Lakhdari et al. 2011; Santos Rocha, Lakhdari et al. 2011), but comparative studies at the species level are rare.

The *in vitro* tests that we have set up to analyze the immunomodulatory effects of more than one hundred strains have a predictive value and allows us to reduce the number of bacterial strains to be tested in animal models. This predictive feature conducted *in vitro* was demonstrated for the first time by Foligne *et al.* in 2007.

The approach using PBMCs has been successfully used to identify or to confirm immunomodulatory properties of different bacterial strains (Drouault-Holowacz, Foligne et al. 2006; Foligne, Nutten et al. 2007; Sokol, Pigneur et al. 2008; Foligne, Dewulf et al. 2010; Perez-Cano, Dong et al. 2010). As these cells are isolated from humans and to avoid result's variability, it is recommended to use PBMCs from the same donor. In 2007, Foligne *et al.* have screened 13 bacteria for their immunomodulatory properties after co-incubation with human PBMCs to identify anti-inflammatory strains by the quantification of cytokines as IL-10 or IL-12. To classify the bacteria according to their immunomodulatory profile, they calculated the IL-10/IL-12 ratio for each bacterium. This ratio permits to distinguish between a pro-inflammatory profile (weak ratio) and an anti-inflammatory profile (strong ratio). Therefore, the most anti-inflammatory strain *in vitro* provided the highest protection in a murine model of colitis. Thus, they correlated the predictive results *in vitro* with those obtained *in vivo* (Foligne, Nutten et al. 2007).

HT-29 cells were also successfully used to evaluate the immunomodulatory properties of bacteria (O'Hara, O'Regan et al. 2006; Delcenserie, Martel et al. 2008; Chang, Shim et al. 2009; Sanz and De Palma 2009; West, Pyne et al. 2009; Grimoud, Durand et al. 2010). Once

co-incubation with bacteria strains is achieved, IL-8 quantification led to the selection of anti-inflammatory bacteria (reducing the IL-8 production) and pro-inflammatory bacteria (enhancing the IL-8 production) (O'Hara, O'Regan et al. 2006; Delcenserie, Martel et al. 2008; Chang, Shim et al. 2009; Sanz and De Palma 2009; West, Pyne et al. 2009; Grimoud, Durand et al. 2010).

Various LAB as *Lactobacillus fermentum* CECT5716 or *L. casei* DN 114-001 have been described recently to enhance the effects of influenza vaccination and improving antibody response to influenza virus vaccination respectively. A mixture of *L. gasseri*, *Bifidobacterium longum* and *B. bifidum* reduced the severity of symptoms related to common cold episodes (de Vrese, Winkler et al. 2006; Olivares, Diaz-Roperero et al. 2007; Boge, Remigy et al. 2009). Probiotics use against influenza virus is attractive because the vaccine is not always well tolerated and the changes of dominant viral strains from one year to another impose the design of new vaccine each year (Boge, Remigy et al. 2009; Nagai, Makino et al. 2011).

The aim of this study is to determine the immunomodulatory properties of a large set of LAB using HT-29 cell line and PBMCs. After establishing the cytokine production profile for the collection of 158 strains, we distinguished pro-inflammatory strains from neutral and anti-inflammatory ones. The most responsive strain *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1997 with pro-inflammatory profile was then studied then *in vivo* in a murine model of influenza A virus (IAV) infection with the H1N1 PR8/34 virus adapted to mice. CNRZ 1997 strain procured protection against IAV infection to mice at a dose of 100 PFU on i) weight loss, ii) clinical score and iii) virus titer in lungs.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. One hundred fifty eight strains, including a majority of LAB (90 *Lactobacillus* spp., 31 *Lactococcus* spp., 31 *Bifidobacterium* spp., 3 *Streptococcus* spp., 2 *Pediococcus* spp. and 1 *Bacillus* spp., Table 1), from INRA collection were studied for their immunomodulatory properties. *Lactococcus* and *Streptococcus* spp. were grown in M17 medium (Difco, Kansas, USA) supplemented with 5 % lactose at 30°C without shaking, *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. in MRS (Difco, Kansas, USA) at 37°C without shaking; *Bifidobacterium* spp. in MRS medium supplemented with 10% cysteine (Sigma Aldrich, France) at 37°C in anaerobic condition (GENbox Microaer; Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) without shaking and *Bacillus* spp. was grown in Luria-Bertani medium (Difco, Kansas, USA) at 37°C with shaking.

Experiments on HT-29 cell line. The human colon carcinoma cell line HT-29 was cultured in 24-wells culture plates in DMEM (Lonza, Switzerland) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1% glutamine at 37°C in 10% CO₂/air atmosphere. Media was changed every day. Experiments were initiated on day 7 after seeding, when cells were at confluence ($\sim 1.83 \times 10^5$ cells/well). Twenty-four hours before bacterial co-culture (day 6), the culture medium was changed for a medium with 5% heat-inactivated FCS and 1% glutamine. Bacteria were added at a multiplicity of infection (MOI) of 1:40 in 0.05 ml DMEM. Cells were stimulated simultaneously with recombinant human TNF- α (5 ng/ml, Propech, New Jersey, USA) for 6 h at 37°C in 10% CO₂. All samples were analyzed in triplicate. After co-incubation, cell supernatants were collected and frozen at -80°C until further analysis of IL-8 concentrations.

IL-8 ELISA. Supernatants from HT-29/bacteria co-cultures were tested for the presence of the pro-inflammatory cytokine IL-8 by ELISA (Biolegend, San Diego, USA) according to the manufacturer's recommendations. All samples were prepared in duplicate.

Experiments on PBMCs. PBMCs were purchased from Stem/Allcells and were isolated from healthy donors. For the first phase of screening, we used PBMCs from one healthy donor (American man, Caucasian, age < 65, body mass index < 30, no smoking, no anti-inflammatory drugs taken during 15 days, negative HIV, hepatitis A and B). Then, for the confirmation phase, we used PBMCs from 5 different healthy donors (same sanitary characteristics). After reception, cells were stored in liquid nitrogen until use. To prepare PBMCs for co-culture experiments with bacteria, the vial cells were thawed at 37°C in a water bath and then transferred into a medium containing RPMI-1640 medium (Lonza, Switzerland) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 1% L-glutamine and 0.1% Penicillin/Streptavidin. DNase (10 mg/ml) was added to this mix to avoid clumping. Cells were then centrifuged at 200 g for 15 min and counted using trypan blue. Finally cells were spread on 24-well plates at 1×10^6 cells/well. Bacteria were added in triplicate at a multiplicity of infection (MOI) of 1:10 in 0.02 ml PBS. Plates were incubated for 24 h at 37°C in 10% CO₂. Samples were stored at -80°C until further analysis of IL-10 and IL-12p70 concentrations.

IL-10 and IL-12p70 ELISA. Supernatants from PBMCs/bacteria co-cultures were tested for the presence of both anti-inflammatory IL-10 and pro-inflammatory IL-12p70 cytokines by ELISA (Mabtech, Sweden) according to the manufacturer's recommendations. All samples were prepared in duplicate.

Mice. Specific pathogen-free BALB/c mice (females, 6 weeks of age; Janvier, France) were maintained under normal husbandry conditions in the animal facilities of the National Institute of Agricultural Research (UEAR, INRA, Jouy-en-Josas, France). All animal

experiments were started after the animals were allowed 2 weeks of acclimation and were performed according to European Community rules of animal care and with authorization 78-149 of the French Veterinary Services.

Influenza virus infection in mice. Influenza A virus (IAV) strain A/PR/8/34 (H1N1, a mouse adapted strain) was grown in allantoic cavities of 11 day old fertile chicken eggs for 2 days at 35°C (Le Goffic, Bouguyon et al. 2010). Viral titer was quantified by a standard plaque assay using Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells and viral stock was stored at -80°C until use. For intranasal infection, mice were fully anesthetized by intraperitoneal injection of Imalgene 1000/ketamine (Merial, France) and Rompun/xylazine (Alcyon, France) (0.1% ketamine + 0.06 % xylazine) and then infected by intranasal application of 50 µl of virus suspension (25 µl into each nostril). This virus infection is supposed to infect the upper respiratory tract of mice.

Preparation of live bacteria inocula and mice administration. Probiotic bacteria candidates were grown as described above. Pellets from overnight cultures were then harvested by centrifugation at 3000 x g at 4°C and washed with sterile PBS. The pellet was suspended in PBS to a final concentration of 1×10^9 CFU. Plate counts were performed with all inocula to corroborate the CFU administered.

Groups of mice ($n=8$) were administered intra-gastrically with 1×10^9 CFU of each strain suspended in 200 µl of PBS (with a feeding needle) 10 days before virus challenge (prophylactic protocol) and 10 or 14 days after (immunotherapy protocol). PBS was used as a negative control. Mice were monitored daily for mortality, weight loss and visual score by scientists blinded to the study. For visual or clinical scores, we used a five-point scale previously published (Kawase, He et al. 2009): 5. Health (no clinical symptoms); 4. Mild (fur slightly ruffled); 3. Moderate (fur moderately ruffled and lethargy); 2. Severe (fur severely

ruffled and thin); 1. Very severe (no reaction to the stimulation). The experimental protocol is presented in Fig. 4.

Sample collection. On days 10 and 14 post infection, blood samples were obtained from the retro-orbital venous plexus, centrifuged and sera stored at -80°C until further analysis. Mice were then sacrificed by vertebral dislocation and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collected. To recover BALF, a catheter was tied into the exposed trachea and a hypodermic needle and syringe was attached and used to inject and withdraw the lungs with a total volume of 1 ml of PBS. BALF samples were stored at -80°C until further analysis. Furthermore, lungs were collected for virus titration and stored in liquid nitrogen at -80°C until analysis.

Viral quantification in mice lungs. Total RNA was isolated using Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, France). Reverse transcription was carried out with a Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, France) and the specific IAV M1 primer: 59-TCT AAC CGA GGT CGA AAC GTA-39 following supplier's recommendations. Viral titers were quantified using quantitative PCR. We used the specific IAV M1 primer: 59-TCT AAC CGA GGT CGA AAC GTA-39 and the Mastercycler realplex (Eppendorf, France). The PCR condition and cycle were as follows: initial DNA denaturation 10 min at 95°C, followed by 40 cycles (15 s at 95°C, 20 s at 64°C and 30 s at 72°C) followed by 15 s at 95°C, 15 s at 60°C, 20 min of melting curve and 15 s at 95°C. To normalize gene expression β -actin levels was determined for all samples (sense: 59-AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC-39; antisense: 59-CTC CTTAAT GTC ACG CAC GA-39) (Le Goffic, Bouguyon et al. 2010).

KC quantification in mice plasma. KC was quantified by ELISA (PeproTech, New Jersey, USA) according to the manufacturer's recommendations.

IFN- β quantification in mice BALF. IFN- β was quantified by ELISA (PBL interferon, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analyses. Data were analyzed using Dunnett's test or t test to compare the difference between groups and controls using Prism software. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

In vitro screening of the bacterial collection

Classification of LAB based on their ability to modulate TNF- α -induced IL-8 secretion by HT-29 cells. In order to determine the immunomodulatory properties of a set of 158 Gram positive strains, we first examined their effect on TNF- α -induced IL-8 secretion by HT-29 cells. Since IL-8 is considered as a major inflammatory mediator, bacteria inhibiting its secretion will be considered as anti-inflammatory strains while those enhancing its secretion will be considered as pro-inflammatory ones. As shown in Fig. 1, among the 158 bacteria tested, 45 displayed a pro-inflammatory profile after co-incubation with TNF- α -induced HT-29 cells, 32 an anti-inflammatory profile and 81 strains (not included in the figure) showed no modulation. None of the bacteria tested induced IL-8 secretion by itself (data not shown).

Classification of LAB based on their ability to modulate IL-12p70 and IL-10 secretion by PBMCs. After co-culture of PBMCs with the different strains, we quantified IL-12p70 and IL-10 cytokines release and then we calculated the IL-12p70/IL-10 ratio. This ratio allows to classify strains with either a pro- or anti-inflammatory profile (high *versus* low IL-12p70/IL-10 ratio, respectively). As shown in Fig. 2, after co-incubation with PBMCs 40 strains displayed a pro-inflammatory profile, while 30 showed an anti-inflammatory profile. Eighty-eight strains (not included in the figure) showed no IL12p70/IL10 modulation.

Selection of the most immunomodulatory strains As mentioned above, only strains presenting either markedly pro- or anti-inflammatory profile according in the two models (HT-29 and PBMCs) are presented in Fig. 1 and 2. Thus, with this double screening, 24 pro-inflammatory strains (hatched histograms) and 7 anti-inflammatory strains (white histograms) were selected for further experiments. Since one of the principal mechanisms of probiotics to protect against allergies and several human respiratory infections is the modulation of pro-

inflammatory cytokines (such as IL-12 and IL-8) (Kawashima, Hayashi et al. 2011), we selected the most pro-inflammatory strain (*L. plantarum* CNRZ 1997, arrow, Fig. 1 and Fig. 2) in both cellular models for validation with five different PBMCs donors (Fig. 3).

Confirmation of the pro-inflammatory profile of CNRZ 1997 *in vitro*. To confirm the pro-inflammatory properties of *L. plantarum* CNRZ 1997 (isolated from yack milk), we studied the IL-10 and IL-12p70 production of PBMCs from 6 different donors (the donor used for the screening and 5 others). Results of IL-12p70/IL-10 ratios presented in Fig. 3A showed that the results obtained with the first donor of PBMC (used for the screening phase) are concordant with those coming from donors 1, 3 and 4. The donors 2 and 5 show lower ratios. Thereby, CNRZ 1997 induces pro-inflammatory response in 4 of the tested donors. To confirm this result, we represent in Fig. 3B floating bars (min to max) with the line at median with IL-12p70/IL-10 ratios obtained from all the donors for the strain CNRZ 1997 and an anti-inflammatory strain identified after the *in vitro* screening (*L. paracasei*, VEL12195). Results show a significant difference between both strains and thus confirm the pro-inflammatory properties of the strain CNRZ 1997.

***In vivo* effects of CNRZ 1997 in IAV murine model**

1) Weight loss. To evaluate the efficacy of CNRZ 1997 strain in the murine model of IAV with H1N1 PR8/34, intragastric gavages with 1×10^9 CFU/mouse were performed to mice which were challenged with the IAV 10 days after the first gavage (Fig. 4). CNRZ 1997 was tested with three different doses of the IAV (2000 PFU, 200 PFU and 100 PFU Fig 5A, 5B and 5C). Intragastric gavages were pursued for 10 days more and weight loss monitored in parallel as major clinical effect after the infection. As positive control, we used *L. casei* DN 114-001 and *L. rhamnosus* LGG, two probiotic strains having well-documented *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties and protective effects in different models of influenza virus infection (Giovannini, Agostoni et al. 2007; Boge, Remigy et al. 2009; Kawase, He et

al. 2009; Guillemard, Tondu et al. 2010; Kawase, He et al. 2011) were used as positive controls.

As shown in Fig. 5A, body weight in all mice groups decreased dramatically after viral challenge with 2000 PFU of IAV strain A/PR/8/34. However, weight loss was interestingly delayed in CNRZ 1997-treated mice and lower than other treatments at day 7 (~20% of their body weight) (Fig. 5A). For viral challenge with 200 PFU (Fig. 5B), mice treated with CNRZ 1997 strain displayed a reduction in weight loss (~12% of their body weight at day 10), in contrast to body weight loss of PBS-treated mice (~25% of their body weight). In this model, no protective effects against infection by the IAV strain A/PR/8/34 of either *L. casei* DN114-001 or *L. rhamnosus* LGG was observed (Fig. 5A and 5B). Altogether, these results demonstrate a tendency of the protective effects of CNRZ 1997 strain in body weight loss after the infection by the influenza virus in mice.

When infecting mice with a viral dose of 100 PFU (Fig. 5C), mice treated with CNRZ 1997 strain displayed a significant reduction in weight loss starting from day 6 post infection (~8% of their body weight at day 10). In addition, weight loss was delayed in CNRZ 1997-treated mice and a faster recovery was also observed when compared to PBS-treated mice.

2) **Visual score.** For visual scores, mice were daily monitored until day 10 after virus infection according to a five-point scale (see material and methods). In Fig. 6, we only presented the scores obtained at day 0 and day 10 after virus infection. At day 0, the 3 groups of mice showed a score of 5 as expected. In contrast, at day 10, mice infected and treated with PBS present a score of 3 (moderate symptoms) while mice receiving CNRZ 1997 strain showed a score of 3.78, suggesting that CNRZ 1997 treatment alleviates significantly clinical symptoms in infected mice.

3) **Influenza virus titer in infected mice lungs.** Viral titer was determined in infected mice on days 10 and 14 after infection with 100 PFU of the IAV strain A/PR/8/34

(Fig. 7). Viral titration in the lungs was also quantified in control mice receiving no virus and the result showed, as expected, a total absence of influenza virus. Viral titer was lower in CNRZ 1997-treated mice than in infected control mice on days 10 and 14 post viral infection. Viral titer on mice infected with the IAV and treated with the CNRZ 1997 for 14 days was significantly reduced comparing to viral titer of mice infected with the IAV on day 10 and comparing to viral titer on mice infected with the IAV and treated with the CNRZ 1997 for 10 days. Moreover, a decrease of 76% in viral titration in mice infected with IAV and treated with CNRZ 1997 between days 10 and 14 was observed. The control mice showed a reduction of only 57% in viral titer in lungs, between days 10 and 14 post viral infection. At day 14, mice receiving the CNRZ 1997 strain have almost complete the virus elimination. This result indicates a positive effect of the CNRZ 1997 strain in mice by removing IAV from lungs and mucosal sites.

4) Chemokine KC and cytokine IFN- β production. In order to decipher, at least in part, the protective mechanism of CNRZ 1997 strain in this model of IAV infection in mice, we measured the concentration levels of chemokine KC in plasma 4 days before and on days 3, 10 and 14 after IAV infection. No differences between KC concentration during time (D-4, D3, D10 and D14) in different mice groups (data not shown) was observed.

When quantifying the IFN- β production in BALF on day 14 (Fig. 8), infected mice with 100 PFU of IAV strain A/PR/8/34 and treated with CNRZ 1997 for 10 days before viral infection and 14 days post infection, showed a non significant increase in IFN- β production comparing to infected mice and non infected mice.

DISCUSSION

A lot of researches focused on studying the *in vitro* and *in vivo* effects of bacteria showed the prediction of *in vivo* effect of bacteria according to their *in vitro* effects (Foligne, Nutten et al. 2007). The choice of the *in vitro* model to be used remains tricky.

In our study, we first studied the *in vitro* large scale screening of immunomodulatory effects of a collection of 158 strains using HT-29 epithelial cells and PBMC (from the same donor). To confirm these immunomodulatory effects for selected strain showing pro-inflammatory profile in both models, a second screening using PBMC from different donors was performed. We finally identified one pro-inflammatory strain that we tested *in vivo* using a model of IAV infection in mice. These *in vitro* methods that we set up to study the immunomodulatory properties of more than 100 bacteria permit us to decrease considerably the number of candidate strains to test *in vivo*.

We used an *in vivo* model of mouse infection with the IAV H1N1 PR8/34 with a dose of 100 PFU per mouse to evaluate the immunomodulatory effects of the CNRZ 1997 strain. This viral dose permits a viral infection with influenza symptoms but causing no mortality in mice. We demonstrated that the pro-inflammatory strain *L. plantarum* CNRZ 1997 given orally in preventive (10 days) and curative (10 days) to mice in case of a viral infection by IAV is able to promote mice health. In fact, the strain CNRZ 1997 was effective in preventing the body weight loss and the clinical condition of mice infected with the IAV H1N1 PR8/34. Kawase *et al.* found the same result on clinical symptoms when studying the oral administration of *L. rhamnosus* GG (LGG) and *L. gasseri* TMC0356 isolated from human intestine in a murine model of IAV infection (Kawase, He et al. 2011).

When analyzing the virus titration in lungs on day 10 and 14 post infection, we found that the pro-inflammatory strain CNRZ 1997 was able to decrease the virus titer in mice with a rate of 76% comparing to the control (57% of diminution). This reduction of virus titers

from day 10 to day 14 post infection might suggest that the strain CNRZ 1997 given orally to mice enhanced the elimination of the virus, showing an immunomodulatory effect of this strain in mice.

These results are consistent with those obtained by Kawashima *et al.* who tested the *L. plantarum* LpYU strain (pro-inflammatory profile *in vitro*) in a model of viral infection with the H1N1 virus (A/NWS/33). LpYU strain was administered orally (three doses tested: 0.011 mg/day, 0.21 mg/day and 2.1 mg/day) in mice 7 days before viral infection and 7 days later. The administration of this strain reduced weight loss in mice with the three doses tested in comparison with the control. In addition, 14 days after viral infection, mice regained their starting weight. After mice sacrifice, the authors noted a decrease in viral titration in lung's and BALF's mice. This decrease was a function of increasing bacterial dose administered (Kawashima, Hayashi et al. 2011).

IAV in mice is known to induce the production of cytokines and chemokines in lung tissues and in plasma of infected mice (Hennet, Ziltener et al. 1992; Smith, Schmidt et al. 2007). The cytokines have already been described to contribute to the induction of immune responses after viral infection (Hennet, Ziltener et al. 1992; Murosaki, Yamamoto et al. 1998; Hori, Kiyoshima et al. 2002; Smith, Schmidt et al. 2007; Maeda, Nakamura et al. 2009). In this study, we chose to quantify the KC production in mice plasma on days D-4, D3, D10 and D14. No difference between mice infected with the IAV H1N1 PR8/34 receiving PBS or the CNRZ 1997 strain was observed. The positive effects of the CNRZ 1997 strain is in consequence not driven by these cytokines. The IFN- β production in BALF was studied on days 10 and 14 post infection. On day 10, no difference was observed between the different mice groups (data not shown), however on day 14, we noticed an increase on IFN- β production on infected mice receiving the CNRZ 1997 strain in comparison with control

mice. The enhancement of IFN- β production in BALF might be involved in the protective effect of the CNRZ 1997 strain.

If we chose to test oral live bacteria, in correlation with the subsequent use of potentially probiotic strain in industry, studies show that heat-killed bacteria administered orally can also modulate the immune response in mice and provide protection against viral infections (Maeda, Nakamura et al. 2009; Kobayashi, Saito et al. 2011; Takeda, Takeshita et al. 2011). Other researchs studied the intranasal administration of heat-killed LAB in a model of viral infection in mice. The obtained results showed that *L. gasseri* TMC0356 strain, for example, offered protection to mice against influenza virus by stimulating immune responses mediated respiratory cells (Harata, He et al. 2011).

Studies have also focused on potentiating the vaccination effects with the consumption of products containing immunomodulatory probiotic bacterial strains. These probiotic bacteria not only allow an increase in immune response, but also its maintenance throughout the product consumption (Olivares, Diaz-Ropero et al. 2007; Boge, Remigy et al. 2009). Despite the demonstrated effects of probiotic bacteria, their mechanisms of action are not yet understood, but some hypothesis have been advanced. For example, oral administration of acid exopolysaccharides (EPS) extracts of *L. delbrückii* OLL1073R-1 to mice infected with influenza virus, have provided protection in mice. This protection was also observed with oral administration to mice (infected with the same virus) of a yoghurt fermented with the strain *L. delbrückii* OLL1073R-1 and its EPS, suggesting that these acid EPS are responsible for the immunomodulatory effect of strain (Nagai, Makino et al. 2011). In another study, researchers have identified protective properties of *L. plantarum* LpYU in a model of viral infection by influenza. They also showed *in vitro* that the immunomodulatory effects of this strain (high production of IL-12) were dependent on TLR2, which recognizes the PEG and the LTA of

Gram-positive bacteria (Kawashima, Hayashi et al. 2011). These two findings seem interesting to identify the mechanisms of action of the CNRZ 1997 strain.

Finally, our results demonstrated the feasibility of predicting *in vivo* properties of LAB according to their *in vitro* immunomodulatory profiles based on cytokine production. The oral administration of the most pro-inflammatory strain among 158 strains (*L. plantarum* CNRZ 1997, isolated from yack milk) conferred protection to mice against IAV infection. In next studies, we will try to identify the mechanism of action of this bacterium.

ACKNOWLEDGMENTS

Noura Kechaou is the recipient of a grant from Fonds Unique Interministériel (FUI, France).

We wish to thank all the UEAR (INRA, Jouy en Josas) staff who helped us during the *in vivo* experiments, in particular Laetitia Guedeville and Alice Belleivaire. We also thank Edwige Bouguyon for virus preparation and quantification.

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Classification of the bacterial strains according to IL-8 production by HT-29 inflamed with TNF- α . Cytokine production after the co-incubation of bacteria and HT-29 cells for 6 hours was analyzed by ELISA. The results and expressed by percentage of induction of the HT-29/TNF- α /PBS control \pm SEM, n=3. These values were standardized by expressing them according to the value of the control PBS/TNF α .

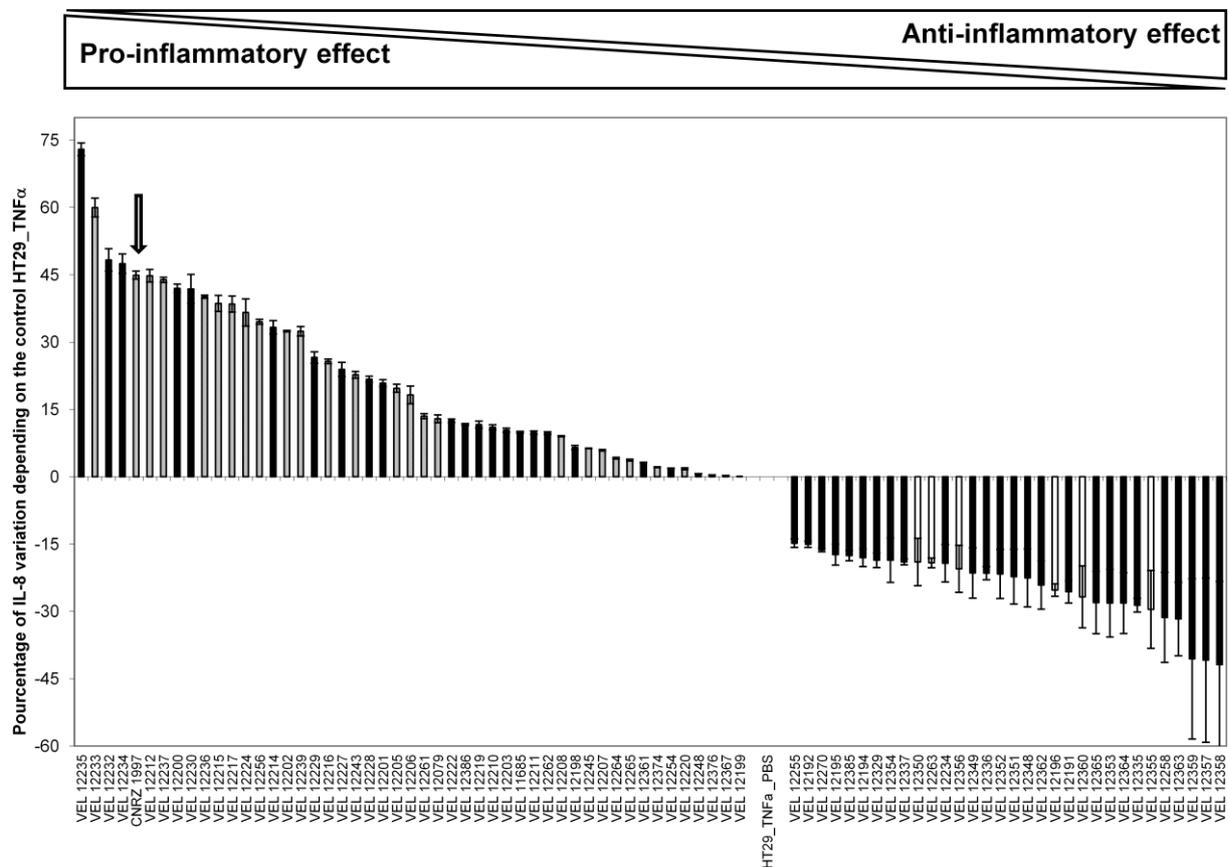


Fig 2. IL-12/IL-10 ratio after bacteria incubation with PBMCs from the same donor. Cytokines were quantified by ELISA after co-incubation of bacteria and PBMCs cells for 24 hours. Ratios of IL-12p70/ IL-10 are expressed \pm SEM, n=3. The ratios were standardized by expressing them according to the value of the control PBS.

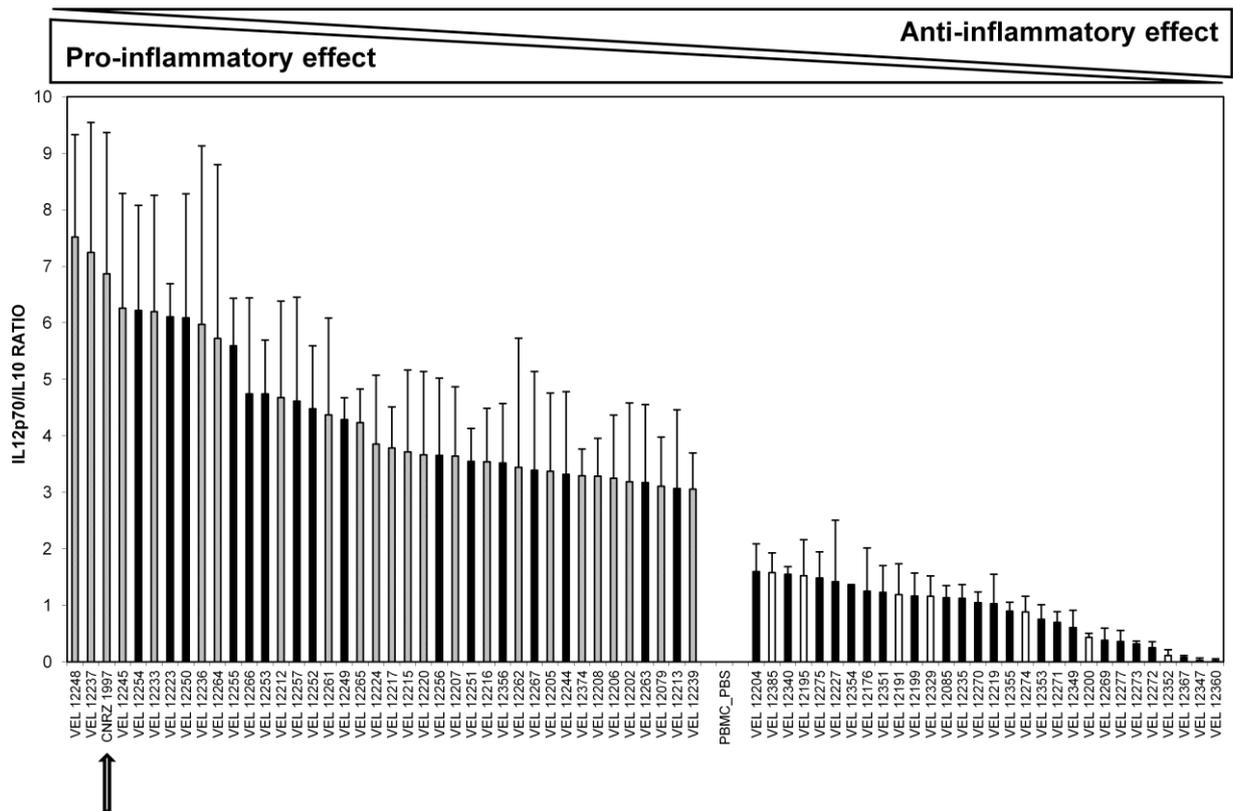
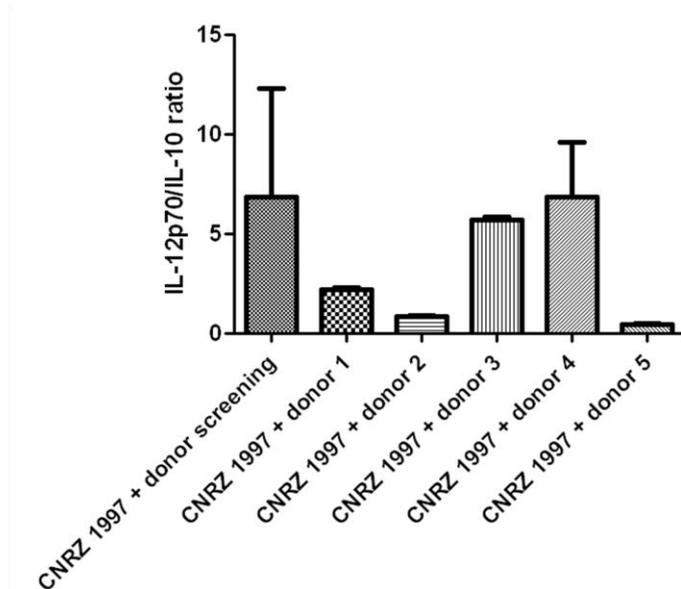


Fig 3. IL-12p70/IL-10 ratios for the selected strains with 5 different PBMCs donors and the PBMCs isolated from the same donor used for the screening phase (donor screening). Cytokines were quantified by ELISA after co-incubation of bacteria and PBMC cells for 6 hours. Ratios of IL-12p70 to IL-10 are expressed \pm SEM, n=3(A). Floating bars (min to max) show the median values for the IL-12p70/IL-10 ratios for one pro-inflammatory strain (CNRZ 1997) and one anti-inflammatory strain (VEL12195) with the six different PBMC donors (B).

A)



B)

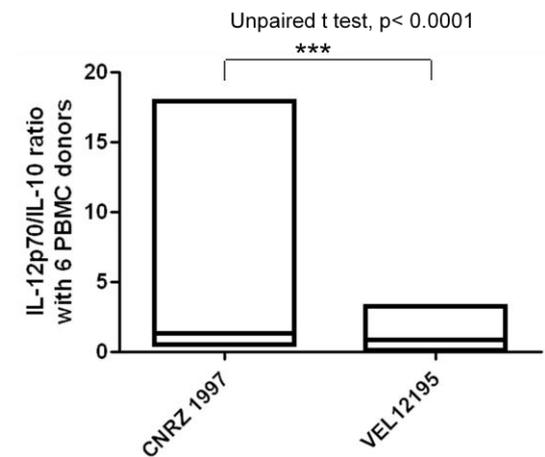


Fig. 4. Protocol used to study the immunomodulatory effect of selected bacteria on mice receiving influenza virus infection with the strain A H1N1 PR8/34 (a mouse adapted strain).

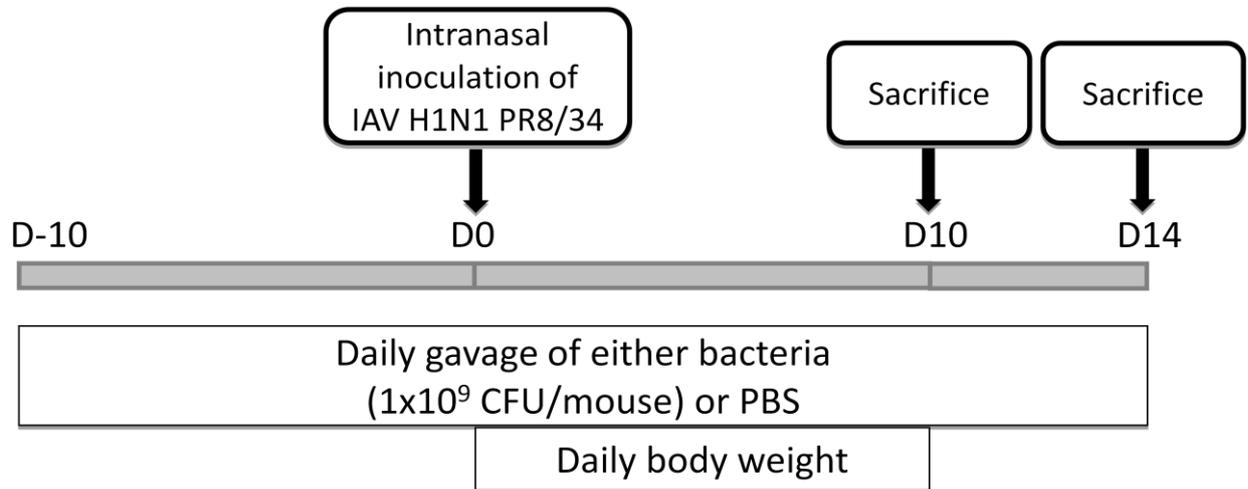
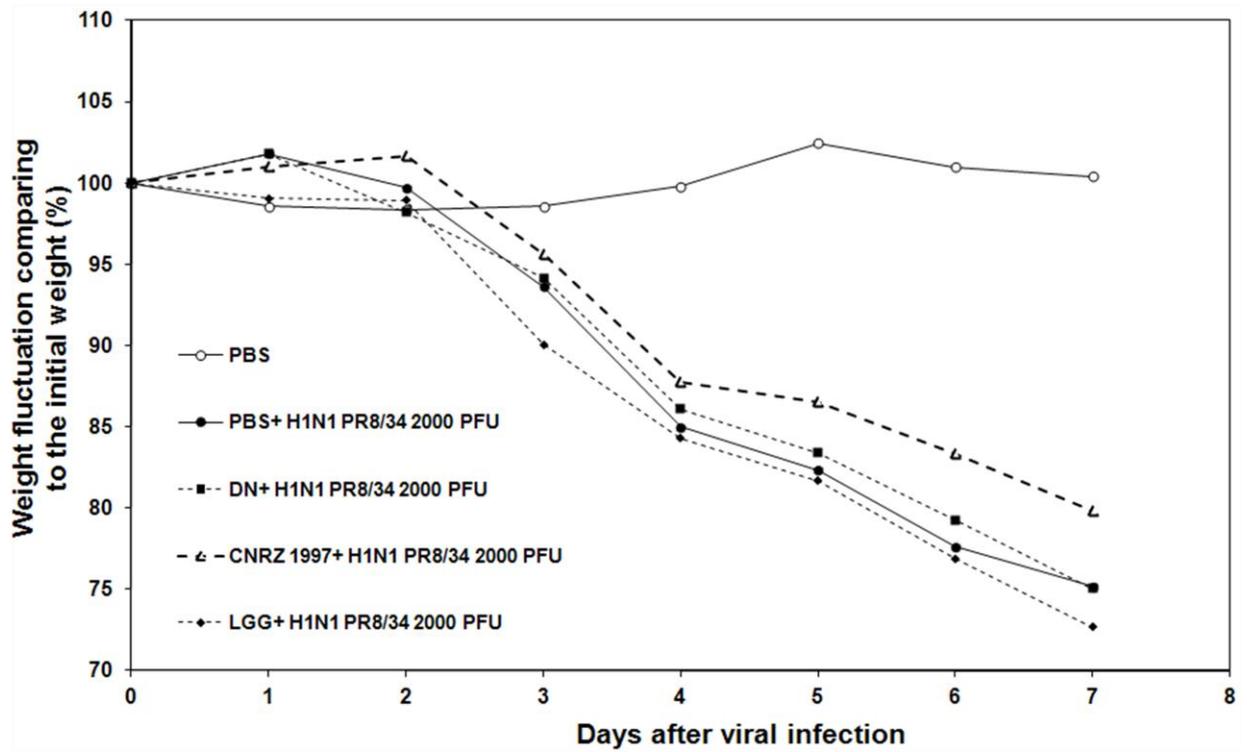
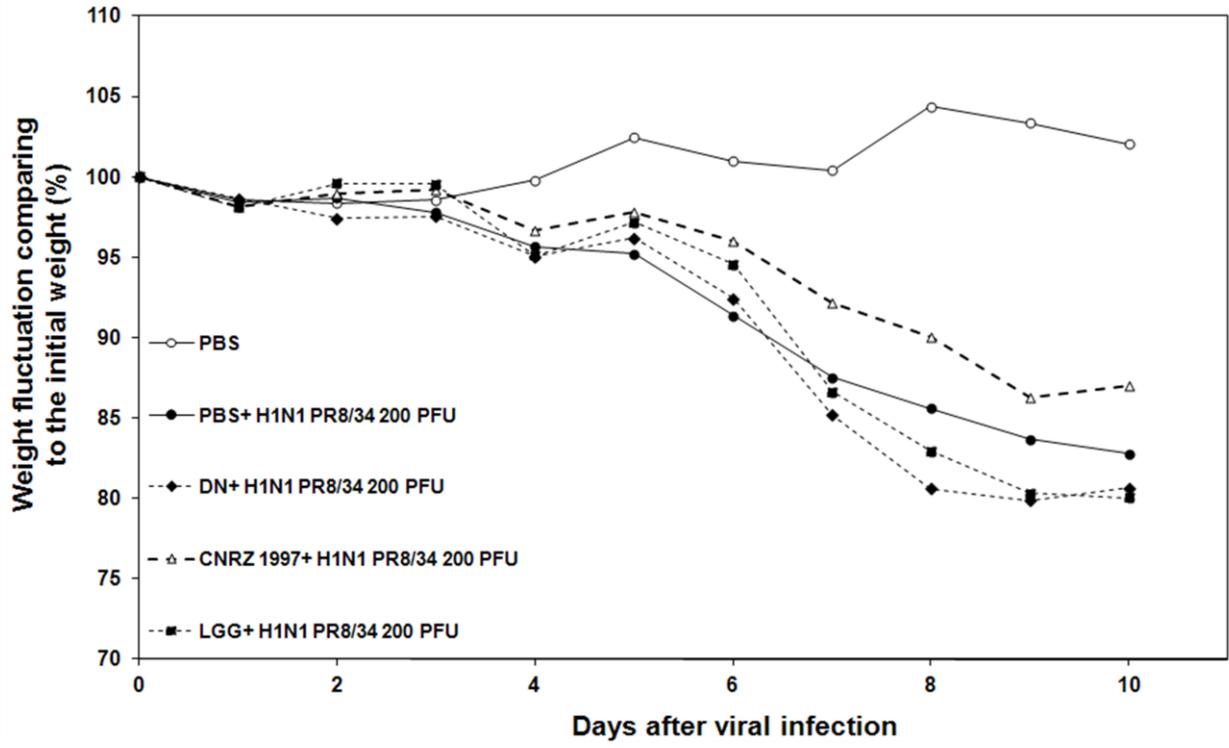


Fig. 5. Mice weight variation after viral infection with 2000 PFU (A) or 200 PFU (B) or 100 PFU (C) of IAV strain A/PR/8/34.

A)



B)



C)

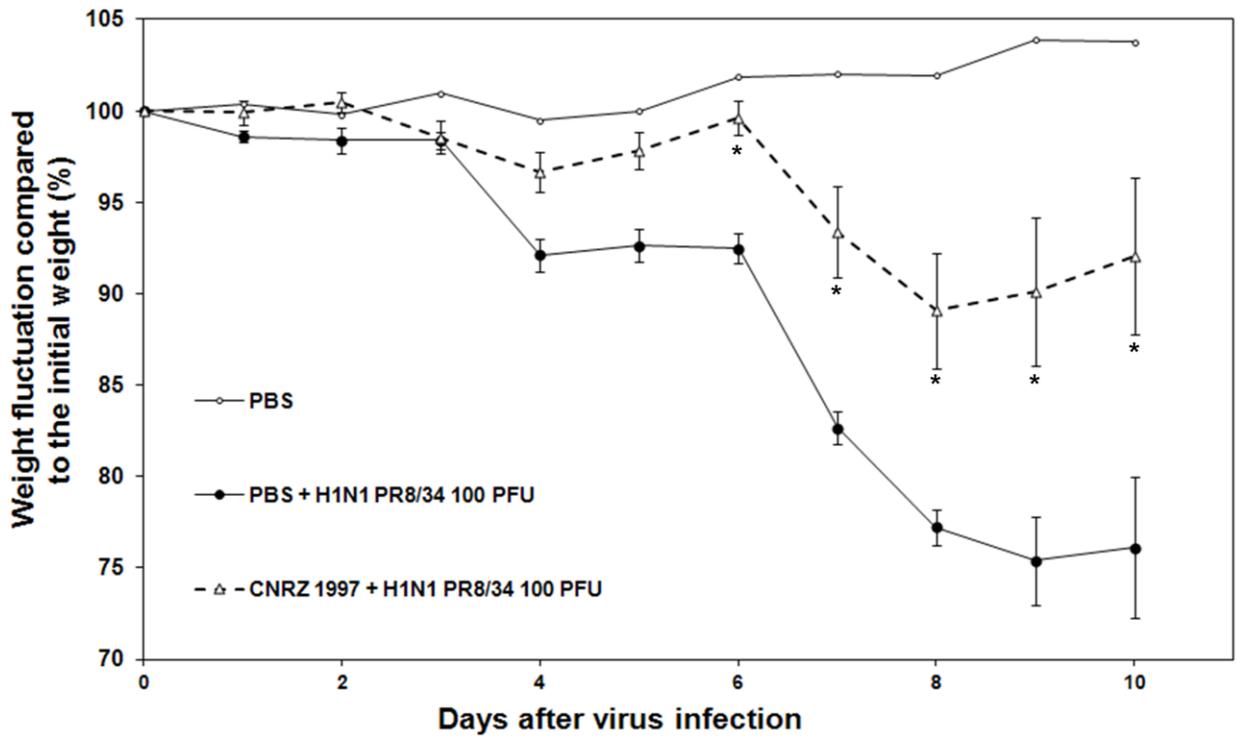


Fig. 6. Mice visual score for the strain CNRZ 1997 after viral infection with 100 PFU of IAV strain A/PR/8/34.

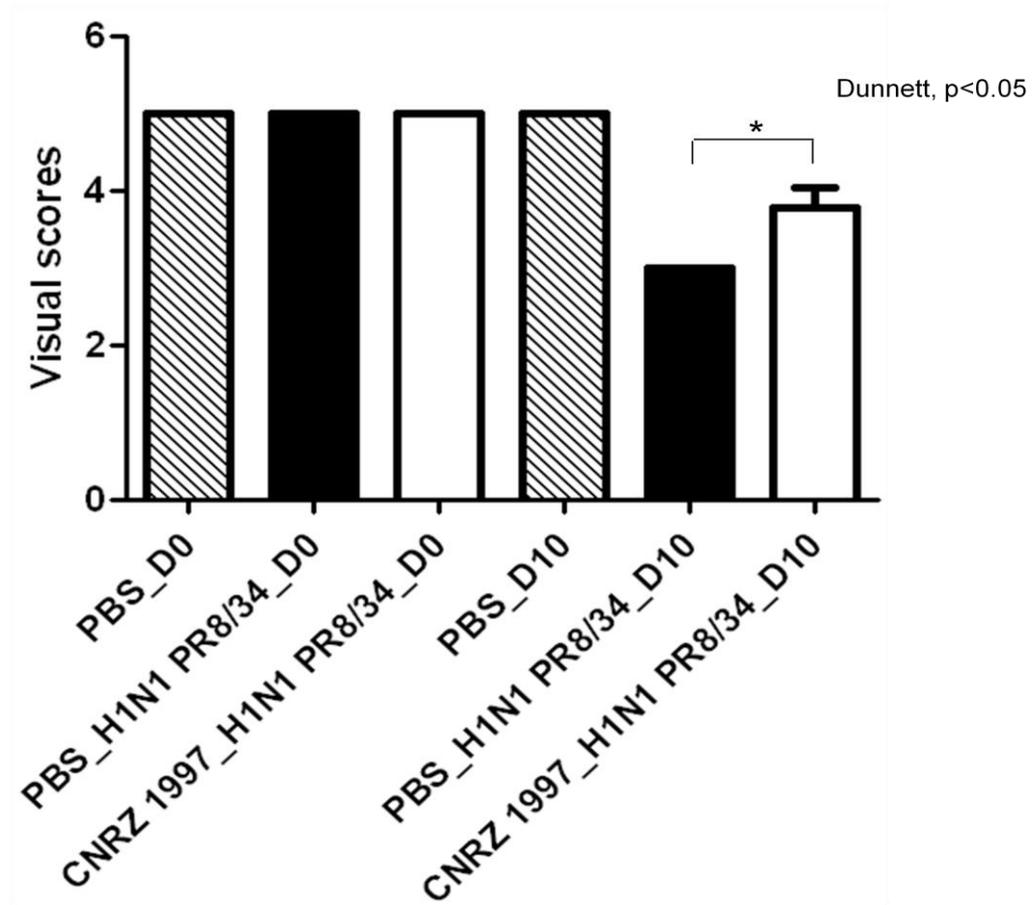
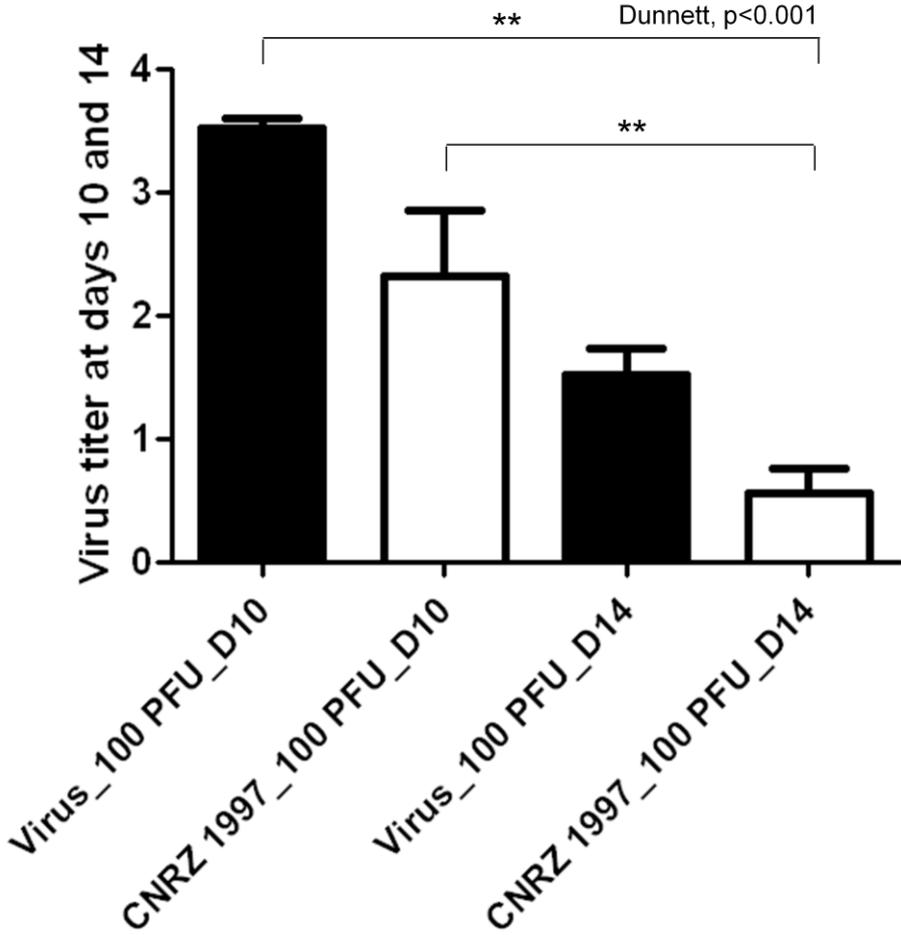


Fig. 7. Virus titer in lungs at day 10 post viral infection. Results are expressed in: log of number of copies of viral genome in 2.5 µg of total RNA.



REFERENCES

- Annuk, H., J. Shchepetova, et al. (2003). "Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates." J Appl Microbiol **94**(3): 403-12.
- Boge, T., M. Remigy, et al. (2009). "A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials." Vaccine **27**(41): 5677-84.
- Bron, P. A., P. van Baarlen, et al. (2011). "Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa." Nat Rev Microbiol **10**(1): 66-78.
- Chang, J. H., Y. Y. Shim, et al. (2009). "Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi." J Appl Microbiol **109**(1): 220-30.
- de Vrese, M., P. Winkler, et al. (2006). "Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial." Vaccine **24**(44-46): 6670-4.
- Delcenserie, V., D. Martel, et al. (2008). "Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract." Curr Issues Mol Biol **10**(1-2): 37-54.
- Drouault-Holowacz, S., B. Foligne, et al. (2006). "Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolerance: in vitro and in vivo considerations." Clin Nutr **25**(6): 994-1003.
- Dunne, C., L. O'Mahony, et al. (2001). "In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings." Am J Clin Nutr **73**(2 Suppl): 386S-392S.
- Foligne, B., J. Dewulf, et al. (2010). "Probiotic yeasts: anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice." World J Gastroenterol **16**(17): 2134-45.
- Foligne, B., S. Nutten, et al. (2007). "Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria." World J Gastroenterol **13**(2): 236-43.
- Forsythe, P. and J. Bienenstock (2010). "Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria." Immunol Invest **39**(4-5): 429-48.
- Giovannini, M., C. Agostoni, et al. (2007). "A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis." Pediatr Res **62**(2): 215-20.
- Grimoud, J., H. Durand, et al. (2010). "In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics." Anaerobe **16**(5): 493-500.
- Grimoud, J., H. Durand, et al. (2010). "In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects." Int J Food Microbiol **144**(1): 42-50.
- Guillemard, E., F. Tondu, et al. (2010). "Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial." Br J Nutr **103**(1): 58-68.
- Guo, X. H., J. M. Kim, et al. (2010). "Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties." Anaerobe **16**(4): 321-6.
- Harata, G., F. He, et al. (2011). "Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses." Lett Appl Microbiol **50**(6): 597-602.

- Hedin, C., K. Whelan, et al. (2007). "Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials." Proc Nutr Soc **66**(3): 307-15.
- Hegazy, S. K. and M. M. El-Bedewy (2010). "Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis." World J Gastroenterol **16**(33): 4145-51.
- Hennet, T., H. J. Ziltener, et al. (1992). "A kinetic study of immune mediators in the lungs of mice infected with influenza A virus." J Immunol **149**(3): 932-9.
- Hori, T., J. Kiyoshima, et al. (2002). "Augmentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed Lactobacillus casei strain Shirota." Clin Diagn Lab Immunol **9**(1): 105-8.
- Kaci, G., O. Lakhdari, et al. (2011). "Inhibition of the NF-kappaB pathway in human intestinal epithelial cells by commensal Streptococcus salivarius." Appl Environ Microbiol **77**(13): 4681-4.
- Kawase, M., F. He, et al. (2009). "Oral administration of lactobacilli from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection." Lett Appl Microbiol **51**(1): 6-10.
- Kawase, M., F. He, et al. (2011). "Heat-killed Lactobacillus gasseri TMC0356 protects mice against influenza virus infection by stimulating gut and respiratory immune responses." FEMS Immunol Med Microbiol.
- Kawashima, T., K. Hayashi, et al. (2011). "Lactobacillus plantarum strain YU from fermented foods activates Th1 and protective immune responses." Int Immunopharmacol **11**(12): 2017-24.
- Kingsley C. Anukam, G. R. (2007). "Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation." Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.
- Kobayashi, N., T. Saito, et al. (2011). "Oral administration of heat-killed Lactobacillus pentosus strain b240 augments protection against influenza virus infection in mice." Int Immunopharmacol **11**(2): 199-203.
- Le Goffic, R., E. Bouguyon, et al. (2010). "Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells." J Immunol **185**(8): 4812-23.
- Maeda, N., R. Nakamura, et al. (2009). "Oral administration of heat-killed Lactobacillus plantarum L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice." Int Immunopharmacol **9**(9): 1122-5.
- Mileti, E., G. Matteoli, et al. (2009). "Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy." PLoS One **4**(9): e7056.
- Murosaki, S., Y. Yamamoto, et al. (1998). "Heat-killed Lactobacillus plantarum L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice." J Allergy Clin Immunol **102**(1): 57-64.
- Nagai, T., S. Makino, et al. (2011). "Effects of oral administration of yogurt fermented with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice." Int Immunopharmacol **11**(12): 2246-50.
- O'Hara, A. M., P. O'Regan, et al. (2006). "Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by Bifidobacterium infantis and Lactobacillus salivarius." Immunology **118**(2): 202-15.
- Olivares, M., M. P. Diaz-Ropero, et al. (2007). "Oral intake of Lactobacillus fermentum CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination." Nutrition **23**(3): 254-60.
- Pagnini, C., R. Saeed, et al. (2010). "Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 454-9.

- Perez-Cano, F. J., H. Dong, et al. (2010). "In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk." *Immunobiology* **215**(12): 996-1004.
- Pham, L. C., M. A. Hoogenkamp, et al. (2010). "Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on saliva-derived microcosms." *Arch Oral Biol* **56**(2): 136-47.
- Rafter, J., M. Bennett, et al. (2007). "Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients." *Am J Clin Nutr* **85**(2): 488-96.
- Rigaux, P., C. Daniel, et al. (2009). "Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy." *Allergy* **64**(3): 406-14.
- Santos Rocha, C., O. Lakhdari, et al. (2011). "Anti-inflammatory properties of dairy lactobacilli." *Inflamm Bowel Dis*.
- Sanz, Y. and G. De Palma (2009). "Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function." *Int Rev Immunol* **28**(6): 397-413.
- Sazawal, S., G. Hiremath, et al. (2006). "Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials." *Lancet Infect Dis* **6**(6): 374-82.
- Shida, K. and M. Nanno (2008). "Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff." *Trends Immunol* **29**(11): 565-73.
- Smith, M. W., J. E. Schmidt, et al. (2007). "Induction of pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza." *Comp Med* **57**(1): 82-9.
- Snel, J., Y. M. Vissers, et al. (2010). "Strain-specific immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* strains on birch-pollen-allergic subjects out of season." *Clin Exp Allergy* **41**(2): 232-42.
- Sokol, H., B. Pigneur, 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**(43): 16731-6.
- Sorokulova, I. (2008). "Preclinical testing in the development of probiotics: a regulatory perspective with *Bacillus* strains as an example." *Clin Infect Dis* **46 Suppl 2**: S92-5; discussion S144-51.
- Takeda, S., M. Takeshita, et al. (2011). "Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products against influenza infection in mice: Alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity." *Int Immunopharmacol* **11**(12): 1976-83.
- van der Aa, L. B., W. M. van Aalderen, et al. (2010). "Synbiotics prevent asthma-like symptoms in infants with atopic dermatitis." *Allergy* **66**(2): 170-7.
- Vasiljevic, T. a. S. N. P. (2007). "Probiotics-From Metchnikoff to bioactives." *International Dairy Journal* **18**: 714- 728.
- West, N. P., D. B. Pyne, et al. (2009). "Probiotics, immunity and exercise: a review." *Exerc Immunol Rev* **15**: 107-26.