



HAL
open science

Implications des N-acyl homosérine lactones, molécules du quorum sensing dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales

Cécilia Landman

► **To cite this version:**

Cécilia Landman. Implications des N-acyl homosérine lactones, molécules du quorum sensing dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales. Microbiologie et Parasitologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066489 . tel-01807764

HAL Id: tel-01807764

<https://theses.hal.science/tel-01807764v1>

Submitted on 5 Jun 2018

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394 Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

ERL INSERM UPMC U1157/UMR 7203

Microorganismes, molécules bioactives et physiopathologie intestinale

Implications des *N*-acyl homosérine lactones, molécules du quorum sensing dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales

Par Cécilia Landman

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Philippe Seksik

Présentée et soutenue publiquement le 28 novembre 2017

Devant un jury composé de :

M TOUNIAN Patrick	Professeur UPMC	Président de Jury
M AMIOT Aurélien	Maître de conférences UPEC	Rapporteur
M GERARD Philippe	Directeur de recherche INRA	Rapporteur
Mme DOUARD Véronique	Chargée de recherche INRA	Membre du jury
M BARNICH Nicolas	Professeur Université d'Auvergne	Membre du jury
M SESIK Philippe	Professeur UPMC	Membre du jury invité

REMERCIEMENTS

Merci au Professeur Patrick Tounian de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Merci aux Docteurs Aurélien Amiot et Philippe Gerard qui ont aimablement accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Merci au Docteur Véronique Douard d'avoir été ma tutrice et d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse, toujours avec bienveillance.

Merci au Professeur Nicolas Barnich de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Merci à Philippe Seksik, mon directeur de thèse, pour son enthousiasme et son soutien. Une fois que je t'ai convaincu de diriger ma thèse, tu as toujours été disponible dans les avancées importantes mais aussi dans les moments de doute, de découragement. Au-delà de tes qualités de clinicien et de chercheur, de ta vision originale et claire, c'est surtout tes qualités humaines qui m'ont permis d'arriver jusqu'au bout.

Merci à Dominique Rainteau pour son enthousiasme, son investissement sans faille dans le sujet. Grâce à toi, aux moments passés entre les solvants et la machine à discuter, j'ai pu apprivoiser la spectrométrie de masse. Ta bienveillance a été un énorme soutien tout au long de ma thèse.

Merci à Elodie Quévrain, la reine du quorum sensing, d'abord pour avoir été à l'origine de ce projet original et ensuite pour m'avoir accueillie dans le laboratoire, accompagnée et soutenue lorsque j'ai appris à voler (un peu) de mes propres ailes dans le monde de la recherche. Tu as toujours trouvé une solution à mes innombrables questions, avec patience et attention.

Merci à Jean-Pierre Grill, pour son soutien, ses connaissances, son calme et la veille bibliographique continue.

Merci à MAM pour les explications sur la spectrométrie de masse et les fins de journées passées à travailler et à discuter.

Merci à Germain Trugnan pour son accueil dans le laboratoire et son aide en imagerie cellulaire.

Merci à Harry Sokol pour ses explications, ses conseils et ses remarques toujours pertinentes.

Merci à toute l'équipe de chimistes, Jean-Maurice Mallet, Solange Lavielle et Gerard Chassaing, pour leur expertise, leurs idées et leur gentillesse.

Merci à Gerard Bolbach et Gilles Clodic pour la spectrométrie de masse haute résolution qui a été décisive.

Merci à Philippe Marteau pour son enthousiasme et son aide précieuse.

Merci à Ginette Thomas pour son aide, ses conseils, sa franchise et sa gentillesse.

Merci à Alison, à Charlène, à Marie, à Myriam, à Mélanie, à Hajar avec lesquelles j'ai travaillé, j'ai ri, et qui m'ont tellement aidée.

Merci à Loic Brot, Lydie Humbert, Wahiba Chaara, Thomas Bazin, Cécile Poret, Eric Le Balc'h, Sophie Thenet, Florian Chain et Kevin Perez pour leur investissement dans le sujet et leur aide précieuse.

Merci à Claire, Valentin, Lucas, My Linh, Sarah, Trang, Joelle, Lucette, Sophie et tous les autres membres du laboratoire U1157 pour les moments joyeux et les gâteaux partagés.

Merci à toute l'équipe médicale de Gastroentérologie de l'Hôpital Saint Antoine, mon quorum professionnel, pour m'avoir accueillie et intégrée dans le service. C'est un plaisir de travailler avec vous au quotidien.

Merci à Laurent Beaugerie de m'avoir choisie pour rester dans le service.

Merci à Isabelle Nion-Larmurier, Guillaume Le Gall, Julien Kirchgesner pour leur aide au quotidien.

Merci particulièrement à Anne Bourrier qui m'a poussée vers le laboratoire dès mes premiers jours d'interne et qui m'a toujours amicalement soutenue.

Merci à l'équipe paramédicale et aux patients.

Merci à toute ma famille, ma belle-famille, mes amis qui m'entourent et me soutiennent.

Merci particulièrement à Sarah, pour les heures côtes à côtes à écrire qui m'ont rappelé le collège, pour ton écoute et ta relecture attentive.

Merci à ma mère pour ton soutien, tes inquiétudes, ton regard protecteur qui me rassurent.

Merci à mon père, pour toi j'ai réussi à retrouver un peu de psychanalyse dans le microbiote en écoutant le langage des bactéries.

Merci à Ava, qui m'a accompagnée sans le savoir au laboratoire avant de me regarder écrire.

Merci à Fabien, toujours à mes côtés, pour les soleils partagés et ceux à venir.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	5
ABBREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION GENERALE	11
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I. LE MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN	15
I.A. Description du microbiote intestinal humain	15
I.A.1. Biodiversité et mise en place	15
I.A.2. Stabilité –Résilience	16
I.A.3. Structure et description classique et moléculaire	17
I.B. Fonctions du microbiote	18
I.B.1. Effet barrière et fonctions immunitaires.....	19
I.B.2. Fonctions métaboliques	19
I.B.2.a. Métabolisme des glucides.....	20
I.B.2.b. Métabolisme des gaz	20
I.B.2.c. Métabolisme des protéines.....	20
I.B.2.d. Métabolisme des lipides	21
I.C. Concept de dysbiose et implication du microbiote en pathologie humaine	22
I.C.1. Définition de la dysbiose	22
I.C.2. Microbiote intestinal et pathologies humaines	22
II. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES	24
II.A. Maladie de Crohn et rectocolite hémorragique	24
II.B. Histoire naturelle et impact des traitements.....	25

II.B.1. Rectocolite hémorragique.....	25
II.B.2. Maladie de Crohn	27
II.C. Physiopathologie	29
II.C.1. Facteurs génétiques	29
II.C.2. Facteurs environnementaux	30
II.C.3. Anomalies épithéliales et facteurs immunologiques	31
II.C.4. Rôle du microbiote intestinal	33
III. DYSBIOSE AU COURS DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES	34
III.A. Description de la dysbiose	34
III.B. Interactions hôte-bactéries.....	35
III.B.1. Rôle de certaines bactéries commensales sur l'inflammation intestinale.....	35
III.B.2. Rôle des métabolites bactériens	36
III.C. Pistes de traitement impliquant la manipulation du microbiote intestinal.....	38
III.C.1. Transplantation de microbiote fécal	38
III.C.2. L'utilisation des antibiotiques et des probiotiques	38
IV. LE QUORUM SENSING	39
IV.A. Définition du quorum sensing	39
IV.B. Quorum sensing impliquant les N-acyl homosérine lactones	40
IV.B.1. Les N-acyl homosérine lactones.....	40
IV.B.2. Systèmes de type LuxI/LuxR.....	41
IV.B.3. Méthodes de détection des AHLs	43
IV.B.3.a. Les biosenseurs ou systèmes rapporteurs bactériens :	43
IV.B.3.b. La spectrométrie de masse :	44
IV.C. Les autres types de quorum sensing.....	45
IV.C.1. Oligopeptides chez les bactéries Gram positif.....	45
IV.C.2. Auto-inducteur 2 (AI-2), le langage universel	46
IV.D.1. Quorum quenching.....	48
IV.D.2. Spécificité variable des systèmes LuxI/LuxR.....	49

IV.E.1. Quorum quenching par les paraoxonases eucaryotes.....	50
IV.E.2. Effets des AHLs sur les cellules eucaryotes	50
IV.E.2.a. Entrée dans les cellules eucaryotes	51
IV.E.2.b. Effet immunomodulateur	51
IV.E.2.c. Effet sur la perméabilité	53
IV.E.2.d. Autres effets cellulaires.....	54
V. QUORUM SENSING ET ECOSYSTEME INTESTINAL.....	54
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	56
I. DECOUVERTE DE LA <i>N</i> -ACYL HOMOSERINE LACTONE 3-OXO-C12 :2, MOLECULE DU QUORUM SENSING MAJEURE DU MICROBIOTE INTESTINAL ET SON EFFET SUR LES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES	57
I.A. Introduction à l'article.....	57
II.B. Article soumis	59
II. RESULTATS COMPLEMENTAIRES <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> SUR L'EFFET DES AHLs 3-OXO-C12 ET 3-OXO-C12 :2	79
II.A. Résultats préliminaires avec la 3-oxo-C12 sur les cellules immunitaires.....	83
II.A.1. Matériel et méthodes	83
II.A.2.Résultats.....	83
II.B.Imagerie cellulaire : localisation de l'AHL 3-oxo-C12 dans les cellules intestinales Caco-2....	84
II.B.1. Matériel et méthodes	84
II.B.2.Résultats.....	85
II.C. Influence de la 3-oxo-C12 et de la 3-oxo-C12 :2 sur le microbiote <i>in vivo</i>	87
II.C.1.Matériel et méthodes	87
II.C.1.a.Animaux.....	87
II.C.1.b.Extraction d'ADN bactérien.....	87
II.C.1.C.Séquençage et analyse statistique	88
II.C.2.Résultats.....	88
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	91

DISCUSSION	92
Découverte d’AHLs dans l’écosystème intestinal par spectrométrie de masse	92
Place de l’AHL 3-oxo-C12 :2 dans l’écosystème intestinal humain	94
Identification de la 3-oxo-C12 :2 et effets <i>in vitro</i>	95
PERSPECTIVES.....	96
Identification d’AHLs	96
AHL 3-oxo-C12 :2 et bactéries commensales.....	96
Rôle de l’AHL 3-oxo-C12 :2 sur le microbiote.....	97
Effets <i>in vitro</i> de l’AHL 3-oxo-C12 :2.....	97
Effets <i>in vivo</i> de l’AHL 3-oxo-C12 :2.....	98
CONCLUSION	100
BIBLIOGRAPHIE.....	102
ANNEXES.....	119
ANNEXE 1 : Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique	120
ANNEXE 2 : Chapitre Livre réanimation Jean-Michel Boles : physiologie de l’appareil digestif et métabolisme : le microbiote	126
ANNEXE 3 : Understanding microbiome data : a primer for clinicians	137

ABBREVIATIONS

ACP : acyl -acyl carrier protein

ADN : acide desoxyribonucléique

AI : auto-inducteur

AIEC : : adherent invasive *Escherichia coli*

AHL : N-acyl homosérine lactone

ARN: acide ribonucléique

BSA : bovin serum albumin

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DHMF : 2,4-dihydroxy-2methylhydrofuran-3-one

DMDS : dimethyl disulfure

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPD : 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione

DSS : dextrane sodic sulfate

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FITC : fluorescein isothiocyanate

FTICR : Fourier-transform ion cyclotron resonance

GC-MS/MS : gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry

HK : histidine kinase

HPLC : high performance liquid chromatography

2HQ : 2-hydroxyquinoline IFN : interféron

IKK : I κ B kinase

IL : interleukine

IQGAP1 : IQ-motif containing GTPase-activating protein

KO : knock out

LPS : lipopolysaccharide

MC : maladie de Crohn

MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales

NFκB: nuclear factor kappa B
NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain 2
PAI : peptides auto-inducteurs
PBMC : peripheral blood mononuclear cell
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PFA : paraformaldéhyde
PON : paraoxonase
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor
QQ : quorum quenching
QS : quorum sensing
RCH : rectocolite hémorragique
RR : régulateur de réponse
SAH : S-adenosyl homocysteine
SAM : S-adenosyl-methionine
SRH : S-ribosyl homocysteine
SVF : sérum de veau fœtal
TLR : toll like receptor
TNBS : acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique
THMF : 2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran
TNF : tumor necrosis factor
WGA : wheat germ agglutinin

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) sont caractérisées par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale conduisant à des dommages anatomiques et une augmentation du risque néoplasique[1,2]. Elles constituent un enjeu socio-économique car elles touchent des sujets jeunes et leur incidence est relativement élevée dans les pays industrialisés (8-15 par 100000 habitants/an)[3,4]. La dysbiose ou déséquilibre entre les populations bactériennes constituant le microbiote intestinal est un élément fondamental de la physiopathologie complexe des MICI[5,6]. Elle se caractérise par une instabilité du microbiote, une perte de sa biodiversité (diversité alpha ou richesse spécifique) particulièrement au sein des Firmicutes et l'expansion de gamma-protéobactéries. L'étude du dialogue entre les bactéries du microbiote intestinal et les cellules de l'hôte (cellules épithéliales, cellules immunes) participant au développement et/ou à la persistance de l'inflammation de la muqueuse intestinale, constitue une part importante et dynamique de la recherche fondamentale dans le domaine des MICI.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux déjà effectués par notre équipe sur ce sujet. En effet, nous avons montré que la dysbiose avait un impact sur les voies de l'inflammation intestinale par la perte d'une bactérie aux propriétés anti-inflammatoires, *Faecalibacterium prausnitzii*[7]. Plus récemment, nous avons également observé que la dysbiose associée aux MICI était un facteur prédictif de rechute après arrêt de l'Infliximab[8]. Ainsi, la sévérité de la dysbiose semble être associée à différents profils évolutifs de MICI. Il paraît donc crucial d'étudier les conséquences de la dysbiose sur les voies de l'inflammation intestinale.

Dans ce cadre, notre intérêt s'est porté sur l'étude de certains métabolites du microbiote. En effet, leur utilisation comme biomarqueurs de la dysbiose associée aux MICI est intéressante. Mais par ailleurs, ces molécules bioactives peuvent avoir un impact sur la régulation des populations bactériennes au sein du microbiote d'une part et d'autre part sur les voies de l'inflammation intestinales chez l'hôte[9,10].

Ce travail de thèse s'intéresse à un sujet jusque-là inexploré, l'étude des molécules de dialogue inter-bactérien ou molécules du quorum sensing (QS). En effet, si ces molécules sont en jeu dans l'écosystème intestinal, il paraît raisonnable qu'elles participent à la l'équilibre des populations bactériennes puisqu'elles exercent leur effet en fonction de la densité des populations bactériennes (effet de quorum). D'autre part, elles peuvent également être impliquées dans l'interaction hôte-bactéries participant ainsi à un dialogue 'inter-kingdom'. Ce sujet innovant fait donc l'objet d'un intérêt particulier lors de l'étude des conséquences de la dysbiose sur les voies de l'inflammation intestinale.

Cette étude exploratoire à la recherche de molécules du QS dans l'écosystème intestinal est translationnelle, s'appuyant sur une cohorte clinique de patients atteints de MICI, sur l'expertise de notre équipe de recherche concernant la détection des métabolites bactériens par spectrométrie de masse et l'analyse du microbiote intestinal. Elle fait l'objet d'un article princeps que l'on peut qualifier de preuve de concept qui fait état des résultats translationnels et de l'effet *in vitro* de ces molécules du QS sur des cellules épithéliales intestinales. Les résultats complémentaires *in vitro* et *in vivo* décrits ensuite ouvrent de nombreuses perspectives quant au rôle de ces molécules au sein de l'écosystème intestinal et plus particulièrement au cours des MICI.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN

I.A. Description du microbiote intestinal humain

Le microbiote intestinal constitue un écosystème complexe dont l'impact sur la santé de l'Homme est aujourd'hui reconnu. Le tube digestif héberge des êtres unicellulaires comme des bactéries mais aussi des virus, des champignons et des micro-organismes très particuliers appelés les archaea qui se différencient des bactéries et du règne animal. Parmi tous ces micro-organismes, les bactéries forment le groupe le plus représenté. On considèrera donc que les données se référant au microbiote intestinal concernent les bactéries qui colonisent notre tube digestif. Ce compartiment devient un élément important de la physiologie humaine à mesure que l'on reconnaît plusieurs fonctions physiologiques portées par ce microbiote. Même si son étude reste encore du domaine de la recherche, une bonne connaissance de cette entité apparaît nécessaire pour appréhender les avancées en cours visant à manipuler ce microbiote dans un but thérapeutique.

I.A.1. Biodiversité et mise en place

Le microbiote intestinal humain contient environ 10^{13} bactéries[11] réparties en 4 phyla bactériens: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, et Proteobacteria et représente l'un des écosystèmes les plus complexes présents à la surface de la terre. Le microbiote intestinal d'un individu adulte est représenté par plusieurs centaines d'espèces bactériennes différentes et il est stable au cours du temps[12,13]. Plus de 80% des espèces bactériennes appartenant à cet écosystème ne sont pas cultivables. La plus grande partie des informations concernant cet écosystème a donc été générée grâce à des méthodes moléculaires basées sur le séquençage du gène bactérien codant l'ARN ribosomal 16S. La majorité des études ont été réalisées sur des échantillons de selles. La combinaison de méthodes culture-dépendantes et culture-indépendantes a permis de déterminer que les genres *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* et *Fusobacterium* dominaient le microbiote fécal. A la naissance, le tube digestif du nouveau-né est dépourvu de bactérie. La colonisation microbienne débute dès les premiers instants de vie. En l'absence des mécanismes immunitaires sophistiqués de l'adulte, le tube digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif et les niveaux de population y atteignent rapidement 10^{11} bactéries par gramme de contenu. La colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé, sous la dépendance de facteurs exogènes (d'origine maternelle, alimentaire) et endogènes tels que les sécrétions du tube digestif mais aussi les produits des premiers micro-organismes colonisateurs qui globalement conditionnent la physico-chimie du biotope[14]. Les bactéries anaérobies qui dominent le microbiote intestinal de l'adulte font partie des premiers micro-organismes rencontrés lors d'une

naissance par voie basse. La mise en place successive d'espèces bactériennes conduit vers l'âge de deux ans à un microbiote stable au plan fonctionnel. Ces bactéries se répartissent tout le long du tube digestif selon des concentrations croissantes depuis des parties hautes jusqu'au colon distal. Il existe quelques bactéries dans l'estomac et les parties supérieures de l'intestin grêle. Les concentrations vont croissantes jusqu'à atteindre 10^8 bactéries par gramme de contenu dans l'iléon terminal. Les bactéries anaérobies facultatives dominent dans l'intestin grêle alors que les bactéries anaérobies strictes dominent les bactéries anaérobies facultatives dans le côlon distal et les selles par un facteur de 1000 environ. La densité bactérienne atteint son maximum dans le côlon distal avec 10^{11} bactéries par gramme de contenu[15]. L'utilisation d'outils moléculaires a montré que la plus grande partie (deux tiers environ) des espèces dominantes observées dans le microbiote fécal d'un individu lui est propre[15].

1.A.2. Stabilité – Résilience

Une fois le microbiote adulte mis en place, et si les conditions environnementales ne changent pas, la composition en grands groupes bactériens et en espèces dominantes est stable dans le temps. Ainsi, si on réalise une électrophorèse particulière de l'ADN bactérien à partir d'une selle d'un individu, on observe pour chaque individu un « code barre » unique hautement stable dans le temps[13]. Cette notion de stabilité dans le temps du microbiote est nouvelle et fondamentale, rapprochant le microbiote d'une entité structurée et fonctionnelle qui en fait un véritable « organe caché ».

En revanche, les populations sous dominantes, minoritaires, peuvent varier [16]. Des facteurs environnementaux peuvent induire des changements majeurs. C'est le cas de prises d'antibiotiques, de changement dans le régime alimentaire ou encore au décours d'une infection intestinale[17]. Après une perturbation de cet écosystème, le retour à l'équilibre antérieur ou à un nouvel équilibre est une caractéristique importante à connaître. Ce phénomène est appelé résilience du microbiote intestinal. Il s'agit de la mise en route de phénomènes dynamiques écologiques peu connus qui restaurent le microbiote après perturbation. Ceci est bien évidemment à prendre en compte lorsque l'on envisage de moduler le microbiote dans un but thérapeutique. La vitesse de retour à l'état antérieur ou vers un nouvel état stable est un élément mal connu et évalué à quelques semaines ou mois après une prise d'antibiotique[17]. La résilience du microbiote intestinal reste un sujet de recherche majeur, notamment étudié lors des approches de transplantation de microbiote fécale qui commencent à être pratiquées.

1.A.3. Structure et description classique et moléculaire

Le microbiote intestinal est composé de 10^{13} micro-organismes répartis en 160 espèces bactériennes chez un individu parmi le millier d'espèces identifiées dans les cohortes humaines étudiées. Comme il l'a été mentionné précédemment, ces 10^{13} bactéries sont majoritairement réparties en 4 phyla bactériens: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, et *Proteobacteria*. Les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* constituent les deux phyla dominants du microbiote avec une représentativité respective de 60-75% et 30-40%. Vivant dans la plupart des cas en absence d'oxygène, dans un environnement dont les propriétés physico-chimiques sont souvent difficiles à caractériser et à reproduire, ces bactéries intestinales ne peuvent pas être cultivées en laboratoire. Des approches culture-indépendantes basées sur le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S, par exemple, ont été développées afin d'appréhender la grande diversité du microbiote intestinal. Deux types d'échantillons peuvent être analysés afin d'accéder aux espèces bactériennes composant l'écosystème intestinal. Plus précisément, les populations bactériennes liées à la muqueuse et celles contenues dans la lumière intestinale doivent être distinguées. Elles présentent des fonctions et une composition bien différentes. Le biofilm composant le microbiote muqueux à la surface de l'épithélium intestinal possède des fonctions métaboliques particulières de transformation des aliments et d'échange de nutriments ainsi qu'une fonction d'induction et d'éducation du système immunitaire de l'hôte. Le microbiote issu d'échantillons fécaux est le plus souvent étudié en raison de la facilité de collecte des échantillons. Même si l'importance des différences dans la composition et le rôle du microbiote fécal vs le microbiote muqueux est reconnue, elle demeure à ce jour mal évaluée.

Une étude publiée en 2005 dans la revue Science par une équipe américaine de l'Université de Stanford décrit le microbiote intestinal muqueux et fécal d'individus sains[12]. Ces auteurs ont obtenu 11831 séquences codant l'ARNr 16S bactérien et 1524 séquences codant le gène du 16S présent chez les Archées. L'analyse phylogénétique de l'ensemble de ces séquences a permis l'identification de 395 phylotypes bactériens et d'un seul phylotype d'archaea correspondant à *Methanobrevibacter smithii*. Sur les 395 phylotypes, 301 correspondent à des Firmicutes et 95% de ces séquences appartiennent à des bactéries du groupe Clostridia. Certaines de ces séquences (42), correspondent à des bactéries produisant du butyrate et appartenant aux clusters IV, XIVa et XVI de ce groupe Clostridia. Parmi les 65 séquences correspondant à des Bacteroidetes, de plus grandes variations ont été observées entre les individus. Dans ce phylum, *Bacteroides thetaiotaomicron* a été retrouvé chez tous les individus. Ensuite, quelques séquences seulement correspondant aux *Proteobacteria*, aux *Actinobacteria*, aux *Fusobacteria* et aux *Verrucomicrobia* ont été identifiées.

En raison d'une diminution des coûts du séquençage haut-débit de l'ADN et de l'amélioration des outils d'analyse bio-informatique, il est aujourd'hui possible de comparer la composition des communautés bactériennes du tractus digestif d'un grand nombre de sujets : enfant, adulte, personne âgée, patients obèses, patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, etc.... L'analyse de l'ensemble des génomes bactériens présent dans un écosystème donné est appelée analyse métagénomique. De grands programmes d'analyse du métagénome intestinal humain ont été entrepris ces dernières années (MetaHIT)[18]. Dans ce programme MetaHIT, l'analyse de 396 échantillons de selles a permis d'obtenir un catalogue de 3,9 millions de gènes répartis dans 7381 groupes de co-abondance de gènes. Environ 10% de ces groupes correspondent à des bactéries (plus des ¾ de ces bactéries n'ayant jamais été référencées dans les bases de données). Les 90% restants correspondent à des groupes de virus bactériens (bactériophages), de plasmides (fragments d'ADN bactériens circulaires) ou encore des gènes qui protègent les bactéries d'attaques virales (connus sous le nom de séquences CRISPR)[19].

Selon un séquençage du métagénome, c'est-à-dire de l'ensemble des gènes appartenant à ces bactéries, réalisé à partir de selles collectées auprès de 124 européens en 2009, il y aurait de 1000 à 1150 espèces bactériennes différentes dans le microbiote intestinal. Chaque individu hébergerait environ 160 de ces espèces[19]. Comme attendu, parmi les espèces prédominantes du microbiote, les auteurs ont trouvé des représentants des phyla *Firmicutes* (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium leptum*, *Enterococcus faecalis*, *Roseburia intestinalis*...) et *Bacteroidetes* (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*...), des groupes *Dorea/Eubacterium/Ruminococcus* (*Dorea longicatena*, *Ruminococcus torque*, *Eubacterium hallii*...). Ont également été identifiées, des espèces de *Bifidobacteria*, *Proteobacteria* et des représentants du groupe *Streptococci/Lactobacilli* (*Streptococcus thermophilus*...). Au-delà de l'identification des espèces bactériennes présentes dans l'écosystème intestinal en condition de normobiose, ces analyses métagénomiques permettent également de caractériser les modifications de la composition et les modifications fonctionnelles du microbiote intestinal. Les rôles qu'exerce cette entité sont majeurs pour la physiologie et doivent être portés à notre connaissance afin de pouvoir moduler certaines fonctions physiologiques en modulant le microbiote et/ou appréhender les conséquences fonctionnelles de modifications du microbiote.

I.B. Fonctions du microbiote

La présence permanente d'une importante biomasse bactérienne dans l'intestin exerce des effets physiologiques, pour la plupart bénéfiques pour l'hôte. Le microbiote intestinal peut même être considéré comme un véritable organe à part entière.

1.B.1. Effet barrière et fonctions immunitaires

Il existe dans la lumière intestinale une compétition pour les nutriments et les sites d'adhérence épithéliaux entre pathogènes et bactéries commensales. Par ailleurs le microbiote produit des bactériocines et il est capable de stimuler la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales. Il induit également la production des IgA sécrétoires et favorise le bon fonctionnement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales[20], ce qui diminue l'invasion par des bactéries pathogènes.

Outre ses propriétés de barrière, le microbiote intestinal joue un rôle fondamental dans le développement et la maturation du système immunitaire. La découverte de cette fonction essentielle vient de l'observation des différences entre souris axéniques (élevés en milieu stériles et donc dépourvus de microbiote) et souris conventionnelles (élevées en animalerie classique)[21]. Les souris axéniques présentaient de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal : hypoplasie des plaques de Peyer, diminution des lymphocytes intra épithéliaux, déficit en certaines populations lymphocytaires T, diminution de la sécrétion intestinale d'IgA, de la concentration d'immunoglobulines sériques et de la production de cytokines. Mais le plus intéressant est que ces anomalies ne se cantonnaient pas au système immunitaire intestinal, puisqu'on observait dans la rate et les ganglions lymphatiques des zones lymphocytaires atrophiées. Par ailleurs, quelques semaines après l'inoculation du microbiote de souris conventionnelles à ces souris axéniques, l'ensemble des ces anomalies disparaissaient.

Au-delà de ces observations sur les fonctions globales du microbiote, il semble que certaines espèces bactériennes aient des propriétés spécifiques. L'homéostasie intestinale est notamment sous la dépendance d'un équilibre entre les lymphocytes T effecteurs (Th17 principalement) et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Il a récemment été montré que certaines bactéries stimulent particulièrement les populations Th17 intestinales [22] alors que d'autres stimulent les Treg [23] par l'intermédiaire des acides gras à chaînes courtes qu'elles produisent [24]. Elles participent ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale.

1.B.2. Fonctions métaboliques

Les principales sources d'énergie du microbiote intestinal sont les glucides et les protéines contenues dans les fibres alimentaires non digérées par l'hôte dans le tractus digestif supérieur et qui parviennent dans le côlon. La nature et la quantité des substrats disponibles dépendent donc des individus et de leur régime alimentaire qui constitue un facteur environnemental susceptible d'influencer l'équilibre du microbiote. La biotransformation de ces différents substrats par le

microbiote colique permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance. D'autre part, elle génère la production d'une diversité de métabolites qui sont pour la plupart absorbés et utilisés par l'hôte.

I.B.2.a.Métabolisme des glucides

Selon les individus et leur régime alimentaire, 10 à 60 g de glucides fermentescibles par jour parviennent au côlon. Différents groupes bactériens du microbiote colique avec des activités complémentaires forment une chaîne trophique de dégradation anaérobie des polymères glucidiques en métabolites fermentaires. La première étape est la dégradation des différents polymères en fragments plus petits (oligosides, oses...) qui fait intervenir une grande variété d'hydrolases (polysaccharidase, glycosidases...). Ces enzymes sont produites par les bactéries du microbiote colique dites « fibrolytiques », appartenant principalement aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia*. Les bactéries glycolytiques transforment les glucides ainsi produits en pyruvate en utilisant la voie de la glycolyse. Par la suite, le pyruvate est lui-même transformé *via* différentes voies métaboliques en acides gras à chaînes courtes, produits finaux de la fermentation. Il s'agit de l'acétate produit par la majorité des espèces prédominantes du côlon (*Bacteroides*, *Clostridium*...), du propionate synthétisé principalement par les espèces du genre *Bacteroides* et également par *Propionibacterium* et *Veillonella* et enfin du butyrate produit par les espèces des genres *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*[25].

I.B.2.b.Métabolisme des gaz

L'hydrogène est le gaz majoritairement produit lors des processus fermentaires, et ce en grande quantité de façon quotidienne dans le côlon. Son élimination, essentielle à l'efficacité du processus fermentaire, est possible de plusieurs manières. Il peut être excrété par l'émission de gaz rectaux ou par voie pulmonaire, mais la plus grande partie de l'hydrogène est transformée *in situ* par des bactéries du microbiote colique dites hydrogénotrophes[26]. Les trois types de transformation principaux sont : en méthane par les archées méthanogènes (présents dans le microbiote colique de 30 à 50% des adultes), en acétate par les bactéries acétogènes, et enfin en sulfures au potentiel délétère pour le colonocyte par les bactéries sulfato-réductrices (dont le genre prédominant est *Desulfovibrio*).

I.B.2.c.Métabolisme des protéines

La biodégradation des protéines est quantitativement moins importante que celle des glucides mais elle est fondamentale car les protéines représentent la principale source azotée des bactéries

coliques. Chez certaines espèces (des genres *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Clostridium*...) ne fermentant pas les glucides, les acides aminés sont même utilisés comme principale source d'énergie. Le métabolisme des protéines fait intervenir plusieurs espèces ayant des activités complémentaires. Les bactéries dites « protéolytiques », appartenant aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*, sont capables par leur activité protéasique d'hydrolyser les protéines en petits peptides. Certaines espèces bactériennes peuvent assimiler ces peptides, ce qui s'accompagne fréquemment de la libération d'acides aminés libres qui seront utilisés par d'autres bactéries incapables d'assimiler directement des peptides. La fermentation des acides aminés utilise plusieurs réactions d'oxydation et de réduction dont la principale est la voie réductrice de désamination et aboutit comme la fermentation des glucides à la formation d'acides gras à chaînes courtes (acétate, propionate, butyrate) mais aussi d'ammoniac. Néanmoins, de nombreux autres composés comme des phénols, des acides di-carboxyliques et des acides gras ramifiés (isobutyrate, isovalerate ...) sont également produits. Les composés phénoliques et indoliques, issus de la dégradation des acides aminés aromatiques et qui sont potentiellement toxiques pour l'hôte sont absorbés et détoxifiés dans la muqueuse colique, puis excrétés dans les urines. L'ammoniac est également absorbé dans le côlon, il rejoint le foie par la circulation portale où il est converti en urée qui sera éliminée par voie urinaire. L'ammoniac est aussi une source majeure d'azote pour un grand nombre de bactéries du microbiote colique qui l'utilise pour la synthèse d'acides aminés grâce à leur activité amino-transférase.

1.B.2.d.Métabolisme des lipides

Les lipides de la lumière colique comprennent les lipides non absorbés dans l'intestin grêle, ceux provenant de la désquamation des colonocytes et les lipides bactériens. Ces acides gras sont transformés (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation...) par les bactéries du microbiote colique. Le cholestérol colique provient pour la majorité de la bile (70%) et pour le reste de l'alimentation (20%) et de la désquamation des cellules épithéliales intestinales (10%). Il est converti par le microbiote en coprostanol qui n'est pas absorbé et donc est éliminé dans les fèces[27]. Cette efficacité est très variable d'un sujet à l'autre et le taux fécal de coprostanol pourrait être impliqué dans la réduction du risque cardio-vasculaire et la cancérogénèse colique. Les acides biliaires, produit de transformation du cholestérol par le foie, sont conjugués à la glycine ou à la taurine, ce qui a pour conséquence une amphiphilie accrue. Quatre-vingt quinze pour cent des acides biliaires suivent le cycle entéro-hépatique : sécrétion biliaire, réabsorption au niveau de l'iléon terminal, retour au foie *via* le système porte, avant d'être à nouveau sécrété dans la bile. Seuls 5% des acides biliaires sécrétés dans la bile parviennent donc au côlon où ils sont métabolisés (déconjugaison, oxydation,

épimérisation, 7 alpha-déshydroxylation, désulfatation...) par les bactéries du microbiote en acides biliaires dits secondaires[28]. La déconjugaison (espèces des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*...) rend les acides biliaires plus hydrophobes et favorise leur absorption passive. Les acides cholique et chénodésoxycholique, acides biliaires primaires principaux chez l'homme, sont transformés par 7 alpha-déshydroxylation par les espèces du genre *Clostridium* en acides desoxycholique et lithocholique (acides biliaires secondaires) qui pourraient avoir un effet carcinogène sur la muqueuse colique. Les hormones stéroïdes et des xénobiotiques suivent également un cycle entéro-hépatique et les mêmes voies métaboliques avec conjugaison hépatique et déconjugaison par le microbiote colique.

En considérant le rôle fondamental que le microbiote intestinal joue dans la réponse immunitaire ainsi que dans différentes voies métaboliques essentielles de l'hôte, on peut facilement imaginer l'impact fonctionnel d'un déséquilibre de ce microbiote sur le développement de différentes pathologies immunitaires et métaboliques.

I.C. Concept de dysbiose et implication du microbiote en pathologie humaine

I.C.1. Définition de la dysbiose

Le microbiote intestinal humain est exposé quotidiennement à des perturbations variées, parmi lesquelles certaines peuvent conduire à une dysbiose, c'est-à-dire une perturbation de l'équilibre de l'écosystème. Cet état de déséquilibre est caractérisé par une perte globale de la biodiversité et une expansion de certaines bactéries maintenues habituellement à un niveau bas dans l'intestin à l'état sain. Les conséquences fonctionnelles de cette modification du microbiote peuvent être à l'origine du développement de nombreuses pathologies ou au moins y participer.

I.C.2. Microbiote intestinal et pathologies humaines

Il est aujourd'hui clairement établi que le microbiote intestinal joue un rôle dans certaines pathologies du système digestif au cours desquelles on peut observer une dysbiose (cancer colorectal, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), mais également dans les cas d'obésité et d'autisme.

L'augmentation de la prévalence de l'obésité ces dernières années est telle qu'elle ne peut être uniquement due à des facteurs génétiques. Le rôle du microbiote intestinal dans le stockage des graisses et l'obésité a été récemment investigué. Des résultats parus dans Nature en 2006 suggèrent que le microbiote intestinal contribue à l'absorption par l'hôte de glucides et de lipides et régule le stockage des graisses[29]. Ces effets seraient liés à l'induction par le microbiote de la lipogenèse

hépatique et du stockage des triglycérides dans les adipocytes. D'autre part, la même équipe a montré que le microbiote de souris obèses (ob/ob), invalidées pour le gène de la leptine, comportait une proportion anormalement élevée de Firmicutes et anormalement basse de Bacteroidetes. De plus, le transfert du microbiote de ces souris obèses à des souris axéniques induisait une augmentation de l'extraction énergétique des aliments ingérés supérieure à celle induite par le transfert d'un microbiote de souris minces. Chez l'homme obèse, il existe, dans le microbiote fécal, une proportion augmentée de Firmicutes et diminuée de Bacteroidetes, comparativement aux sujets minces. De surcroît, la perte de poids semble corrélée avec l'augmentation de la proportion de Bacteroidetes. Ces données récentes suggèrent donc un lien entre le microbiote intestinal et l'obésité[29,30].

En outre, il existe une dysbiose, c'est-à-dire une modification de la composition du microbiote intestinal, chez les sujets souffrant d'un cancer colorectal [31][15]. Dans cette étude, les auteurs ont établi une carte de la dysbiose associée au cancer colorectal en s'intéressant aux espèces bactériennes colonisant les tumeurs *versus* celles retrouvées dans les zones de muqueuses saines adjacentes. Ils ont ainsi montré que les zones du colon touchées par les tumeurs présentaient moins de Firmicutes et plus de Bacteroidetes que les zones saines et représentaient une niche pour les Coriobacteria (Actinobacteria).

L'implication de toxines bactériennes dans la survenue du cancer colorectal a également été montrée. Par exemple, la génotoxicité de souches d'*Escherichia coli* produisant la colibactine, une toxine capable d'induire des cassures double-brin de l'ADN et une instabilité génétique au sein de cellules épithéliales intestinales en culture a été largement démontrée [32]. La colibactine a été montrée comme promotrice de tumeurs colorectales [33].

Enfin, des études préliminaires ont montré qu'il existait une forme de dysbiose chez les enfants autistes avec une diminution de *Akkermansia muciniphila* et de *Bifidobacterium* spp. dans les selles de ces patients [34]. Une autre étude récente a montré, sur des biopsies réalisées chez des enfants présentant un trouble autistique et souffrant de troubles gastro-intestinaux, une augmentation des phylotypes appartenant à la famille Alcaligenaceae et au genre *Sutterella*, particulièrement les espèces *S. wadsworthensis* et *S. stercoricanis*[35].

Pour témoigner de l'influence des bactéries intestinales sur le comportement, l'administration de certains probiotiques a été étudiée. En 2013, un groupe de chercheurs américains a montré que, chez des souris avec des troubles autistiques, l'intestin contenait moins de bactéries de l'espèce *Bacteroides fragilis* que chez les souris témoins. L'administration de cette souche bactérienne a

permis une amélioration des troubles psychomoteurs liés à l'anxiété et une amélioration de la communication entre individus[36].

Une dysbiose a donc été mise en évidence dans plusieurs pathologies digestives mais aussi extra-intestinales, mais c'est dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales qu'elle a été à ce jour la mieux caractérisée.

II. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES

II.A. Maladie de Crohn et rectocolite hémorragique

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) sont caractérisées par une inflammation chronique de la muqueuse intestinale conduisant à des dommages anatomiques et une augmentation du risque néoplasique[2]. Elles évoluent par poussées entrecoupées de périodes de rémission. Elles constituent un enjeu socio-économique car elles touchent des sujets jeunes et leur incidence est relativement élevée dans les pays industrialisés (8-15 par 100000 habitants/an). Cette incidence est en globale augmentation[37]. Elles ne menacent pas le pronostic vital (effet faible sur la mortalité) mais pénalisent de façon importante la qualité de vie. On peut distinguer 2 types de MICI : la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC).

La RCH débute le plus souvent vers l'âge de 25-30 ans. Elle revêt des formes particulières chez le jeune enfant et aussi chez le sujet âgé, surtout masculin, apparaissant notamment après l'arrêt d'une intoxication tabagique. La RCH se présente par une inflammation chronique touchant le rectum et une partie plus ou moins étendue du colon. L'atteinte est continue rétrograde et reste en règle générale superficielle. Les symptômes classiques sont une diarrhée glairo-sanglante et/ou un syndrome rectal, ce qui fait que le délai diagnostique est en général court. La classification de Montréal distingue 3 formes de RCH selon l'extension de la maladie (tableau 1)[38]. Trente pourcents des patients ont une atteinte rectale (E1) au diagnostic, 40% une atteinte distale (E2) et 30% une atteinte étendue (E3). Mais l'atteinte s'étend chez 20% des patients environ au cours de l'évolution de la maladie[39]. Par ailleurs, des RCH authentiques développent secondairement des lésions ano-périnéales ou de l'intestin grêle conduisant au diagnostic secondaire de maladie de Crohn. Cette éventualité a été chiffrée de l'ordre de 10% après 25 ans d'évolution[40].

La maladie de Crohn est habituellement découverte entre 25 et 30 ans à l'occasion d'une poussée inaugurale ou d'une complication, mais elle n'est pas exceptionnelle chez l'enfant ni chez le sujet âgé. Elle peut atteindre n'importe quel segment du tube digestif mais principalement l'intestin grêle et le colon. Les symptômes sont variables, les plus fréquents sont des douleurs abdominales, une diarrhée

et un amaigrissement. Contrairement à la RCH, l'atteinte de la maladie de Crohn est en générale discontinue et transmurale. L'inflammation persistante peut conduire à une destruction intestinale qui se manifeste par des complications à type de fistules, d'abcès et de sténoses qui peuvent nécessiter un recours à une chirurgie de résection intestinale. La classification de Montréal permet de classer la maladie de Crohn selon 3 critères : l'âge au diagnostic, la localisation et le phénotype inflammatoire (B1), sténosant (B2) ou perforant (B3) (tableau 1)[38]. Au diagnostic, environ un tiers des patients ont une atteinte iléale pure (L1), un tiers une atteinte colique pure (L2) et un tiers une atteinte iléocolique (L3). L'atteinte anopérinéale, plus fréquente en cas d'atteinte colique, est observée initialement chez moins d'un quart des patients, et à un moment ou un autre de l'évolution chez environ 50% d'entre eux[41]. Chez un même individu le phénotype est très lié au siège initial des lésions et change au cours de l'évolution de la maladie.

	RCH	Maladie de Crohn
Age au diagnostic		A1 : ≤ 16 ans A2 : 17-40 ans A3 : ≥ 40 ans
Localisation	E1 : rectum uniquement E2 : colon gauche (distale) E3 : étendue (au-delà de l'angle colique gauche)	L1 : iléale L2 : colique L3 : iléocolique L4 : atteinte digestive haute
Phénotype		B1 : non sténosant non perforant B2 : sténosant B3 : perforant p : atteinte périnéale

Tableau 1. Classification de Montréal de la RCH et de la MC [38]

II.B. Histoire naturelle et impact des traitements

Les MICI évoluent habituellement par poussées entrecoupées de rémissions, de façon peu prévisible, enfin de gravité très variable d'un malade à l'autre, et chez le même malade d'une phase évolutive à l'autre. Les données des grandes études de cohorte, notamment danoises ont permis de mieux comprendre leur histoire naturelle[40,42].

II.B.1. Rectocolite hémorragique

La RCH évolue habituellement sous forme de poussées de durée brève sous l'effet du traitement, entrecoupées de rémissions parfois très longues. L'intensité des poussées et leur sensibilité au traitement médical sont très variables et peu prévisibles, même si des poussées rapprochées annoncent souvent une mauvaise réponse au traitement. Dans environ 10% des cas, la maladie évolue d'emblée selon un mode continu, chronique actif, sans rémission. Une autre possibilité

évolutive imprévisible est le développement d'une poussée grave, observée au total chez un patient sur 5, et cause principale de colectomie dans les premières années de la maladie. Le risque cumulé de colectomie dans la RCH est très variable selon les études, le plus souvent de l'ordre de 20-30% après 25 ans. L'extension et la sévérité de la RCH au moment du diagnostic sont les meilleurs facteurs prédictifs du risque de colectomie.

La survie des patients ayant une RCH ne paraît pas globalement différente de celle de la population générale, avec quelques nuances. Il semble en effet exister un petit « décrochage » initial, dans l'année suivant le diagnostic, décrochage en rapport avec les formes graves et fulminantes et les décès péri-opératoires; cette surmortalité initiale a considérablement diminué avec la standardisation de la prise en charge thérapeutique des formes graves. La deuxième nuance par rapport à la population générale porte sur les causes de décès à long terme, on note en effet une augmentation des cancers digestifs et des affections hépatobiliaires. Au contraire, on note une diminution des affections cardiovasculaires et respiratoires liées au tabac du fait de la faible proportion de fumeurs dans la population RCH[4].

Les poussées de RCH sont en règle générale sensibles au traitement médical, proportionné à la gravité clinique et avec une voie d'administration modulée en fonction de l'étendue des lésions. La corticothérapie orale entraîne une rémission complète à partielle chez 55 à 85% des patients, avec un taux de corticodépendance à 1 an de l'ordre de 20%[43]. Le traitement médical intraveineux intensif selon le protocole de Truelove a transformé le pronostic des formes aiguës sévères autrefois mortelles jusque dans un tiers des cas. Ce traitement permet de contrôler environ 2 tiers des poussées sévères. L'infliximab à double dose et plus rarement la ciclosporine sont utilisés chez les non-répondeurs au traitement intensif[44]. Le point notable est que le traitement médical peut permettre à un certain nombre de patients d'échapper à la colectomie et d'avoir ensuite une évolution bénigne. L'azathioprine ou la 6-mercaptopurine, et aussi les anti-TNF et les anti-intégrines en entretien, sont prescrits dans la RCH, soit dans les formes graves en relais du traitement d'attaque, soit dans les formes corticodépendantes et dans les formes distales réfractaires. Les immunosuppresseurs ont clairement un fort effet d'épargne corticoïde. Le recours à la colectomie en raison de l'échec du traitement médical semble devenir moins fréquent à l'ère des antiTNF.

Les patients coloproctectomisés avec anastomose iléo-anale sont exposés au développement d'une pochite, ou inflammation du réservoir iléal. La pochite aiguë est très fréquente (50% des opérés à 5 ans) mais en règle contrôlée par l'antibiothérapie. La pochite chronique est une éventualité rare (5 à 10%) mais de traitement difficile, et peut être interprétée comme une récurrence de la MICI au niveau

du réservoir iléal. L'apparition de lésions iléales en amont du réservoir et de lésions anopérinéales de type Crohn est une autre éventualité[45].

II.B.2. Maladie de Crohn

L'évolution anatomique globale de la maladie de Crohn est mieux connue depuis la description du modèle de la récurrence post-chirurgicale[46,47]. L'évolution naturelle de la maladie de Crohn non opérée semble très proche de celle du modèle de la récurrence post-chirurgicale.

Si la localisation initiale des lésions, au moment de la première poussée, est déterminante des localisations ultérieures, le phénotype, lui, évolue chez un même individu au cours de l'évolution de la maladie. En règle générale, la maladie progresse sur le plan anatomique, avec des lésions de plus en plus sévères au fil du temps. L'imagerie (endoscopie, scanner, IRM) permet de suivre cette progression, mesurable par un index, l'index de Lémann[1] (figure 1). Les études de population telles que celle de l'Olmsted County indiquent un risque cumulé de complication intestinale, perforante ou sténosante, de 50% après 20 ans d'évolution.

Au cours de l'évolution, environ un tiers des patients développent à un moment ou un autre des manifestations extra-digestives, les plus fréquentes étant les manifestations articulaires, cutanées (érythème noueux, pyoderma), buccales (aphtose) et oculaires.

Il est quasi-impossible lors de la première poussée de prédire quelle sera l'évolution ultérieure. Les moins mauvais critères prédictifs de gravité sont l'âge jeune, l'existence de lésions anopérinéales et la nécessité initiale d'un traitement corticoïde, indicateur rétrospectif de la gravité clinique de la première poussée[4].

La progression des lésions anatomiques, mesurable par le « Léman index » (figure 1), finit tôt ou tard par conduire au développement de complications qui ne sont pas accessibles au traitement médical et doivent être opérées. Il arrive aussi, même si cela est plus rare, que la maladie échappe au traitement médical. Dans la cohorte danoise, le risque cumulé de chirurgie d'exérèse intestinale est de 82% à 20 ans[42]. De plus, il est fréquent d'être réopéré et environ 30% des sujets doivent être réopérés 10 ans après une première chirurgie. Chaque année 2 à 3% des patients doivent subir une résection intestinale.

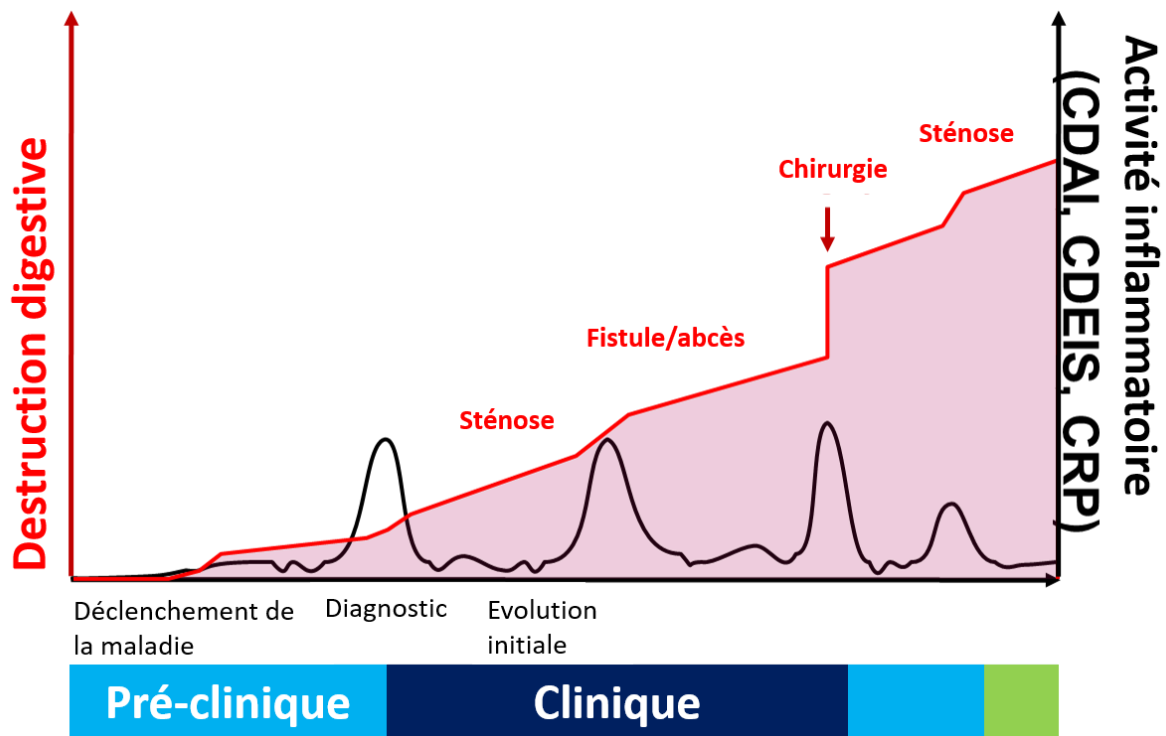


Figure 1. Progression de l'activité inflammatoire et de la destruction intestinale

D'après Pariente *et al*[1]

La mortalité est légèrement augmentée par rapport à une population normale dans la plupart des études de population avec un taux de mortalité standardisé (rapporté à la population générale) de 1,50 (1,32-1,70)[48]. La majorité de la mortalité n'est pas imputable directement à la maladie de Crohn et à ses complications. Le tabagisme, plus fréquent dans une population de malades de Crohn que dans la population générale, explique probablement une partie de l'excès de mortalité[45].

Si les poussées de maladie de Crohn peuvent avoir une évolution spontanément favorable (25 à 40%), leur symptomatologie bruyante nécessite habituellement un traitement rapide. Les corticoïdes entraînent une rémission complète à partielle chez 60 à 90% des patients, mais un tiers d'entre eux deviennent cortico-dépendants et la corticothérapie n'influence pas l'évolution à long terme de la maladie[43]. Les formes corticodépendantes et chroniques actives justifient un traitement immunosuppresseur. L'efficacité à long terme des immunosuppresseurs dans la maladie de Crohn, notamment leur effet d'épargne corticoïde, est incontestable. Cette efficacité clinique est souvent associée à une efficacité endoscopique et histologique. Par exemple, l'azathioprine permet de contrôler durablement l'activité de la maladie près d'une fois sur 2, mais cet effet est seulement suspensif, l'arrêt du traitement exposant le malade à un risque accru de reprise évolutive au cours des mois suivants, quelle que soit la durée du traitement immunosuppresseur[49]. Les anti-TNF sont capables d'entraîner une réponse clinique et anatomique rapide et complète. L'effet sur les fistules

(une sur 2 se ferme) est particulièrement notable car on pouvait penser ces lésions inaccessibles au traitement médical. Mais si le traitement anti-TNF est interrompu, la maladie reprend son cours, une récurrence clinique survient et la fistule se rouvre de façon quasi-inéluctable. Chez quelques malades, le traitement itératif doit être arrêté en raison de l'apparition de manifestations d'intolérance ou d'une perte d'efficacité. Mais l'évolutivité de la maladie et le dégât anatomique qui l'accompagne peuvent être contrôlés pendant plusieurs années chez les sujets répondeurs durables[50]. Même si les données sont contradictoires, il paraît raisonnable d'attribuer au progrès du traitement médical la diminution continue du recours à la chirurgie intestinale ; ainsi, alors que dans les années 90, près de 30% des patients devaient être opérés dans les 5 ans suivant le diagnostic, ce taux diminue régulièrement et est plus proche de 20% aujourd'hui. La chirurgie de résection intestinale pour enlever les lésions macroscopiques de maladie de Crohn peut conduire à un intervalle libre de symptômes mais ne guérit pas la maladie, qui récidive quasi-inéluctablement. Moins de 5% des patients opérés sont indemnes de lésions endoscopiques 10 ans après la chirurgie. Il faut donc concevoir la chirurgie comme le traitement électif des complications ou une aide au traitement médical.

II.C. Physiopathologie

La physiopathologie des MICI est multifactorielle et encore mal comprise. Différentes études ont montré l'influence de facteurs de prédisposition génétique, de l'environnement et enfin du microbiote intestinal. Ces différents facteurs entraînent une dysrégulation de la réponse immunitaire épithéliale qui conduit au développement et à la persistance de l'inflammation de la muqueuse intestinale.

II.C.1. Facteurs génétiques

En premier lieu, l'existence d'une prédisposition génétique dans les MICI est connue depuis longtemps par la présence d'agrégations familiales. Par ailleurs des études réalisées chez des jumeaux (monozygotes vs dizygotes) illustrent son importance, qui est plus marquée dans la maladie de Crohn que dans la RCH. Le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes est de 20 à 50 % pour la maladie de Crohn et de 13 à 19 % pour la RCH alors que chez les jumeaux dizygotes il baisse à 10 % pour la maladie de Crohn et seulement de 0 à 5% pour la RCH[51,52].

La mise en évidence de gènes de susceptibilité a commencé avec l'identification des mutations de NOD2 dans la maladie de Crohn[53]. Ce gène code pour une protéine qui est un récepteur à certains produits de dégradation bactériens comme le muramyl-dipeptide du peptidoglycane et qui joue un rôle dans l'immunité innée. Par la suite, avec les avancées en génétique, plus de 160 gènes de

susceptibilité ont été identifiés. Ces gènes sont pour la majorité partagés par la maladie de Crohn et la RCH et pour certains par d'autres pathologies inflammatoires. À l'exception des gènes NOD2 et IL23R, chacune des variations génétiques, prises individuellement, n'a qu'un effet faible avec risque relatif de développer une MICI de l'ordre d'1,2 (1,5 au plus). Par ailleurs, malgré le grand nombre de gènes identifiés, on estime que leur ensemble n'explique que 20% de la prédisposition génétique aux MICI[54]. Pour ces raisons, la connaissance de ces gènes de susceptibilité a pour l'instant peu d'impact en pratique clinique. En revanche, l'étude de la fonction biologique de ces gènes a permis des avancées dans les mécanismes physiopathologiques des MICI[55].

II.C.2. Facteurs environnementaux

L'absence de concordance parfaite entre les jumeaux monozygotes suggère que des facteurs non génétiques jouent un rôle important, notamment dans la RCH. Plusieurs éléments surtout épidémiologiques témoignent du rôle de l'environnement dans le développement des MICI. D'abord la répartition géographique de l'incidence des MICI et sa forte augmentation est parallèle à l'adoption du mode de vie occidental moderne. De plus, l'incidence des MICI chez les migrants originaires d'une zone de faible incidence vers une zone de forte incidence atteint celle du pays d'accueil après une génération [56]. L'étude des facteurs environnementaux repose sur l'épidémiologie et présente deux limites majeures. Premièrement, il est difficile de déterminer quels sont les facteurs les plus importants, parce que la plupart des facteurs sont liés entre eux. Deuxièmement, les études mettent en évidence une association sans que l'on puisse explorer de lien de causalité.

Les deux facteurs environnementaux clairement identifiés sont le tabac et l'appendicectomie. Ils ont tous les deux un rôle inverse selon le type de MICI. Le tabac a un effet protecteur dans la RCH mais aggrave l'évolutivité de la MC en augmentant le risque de récurrence et le recours à la chirurgie[57–59]. Des études ont montré qu'une appendicectomie pour une appendicite aiguë avant l'âge de 20 ans avait un effet protecteur vis-à-vis de la RCH en réduisant d'environ 70 % le risque d'apparition de cette pathologie [60]. En revanche dans le cas de la MC, même si son effet direct reste difficile à prouver, il pourrait augmenter le risque de survenue de la maladie [61].

De nombreux autres facteurs environnementaux, tels que les médicaments et notamment les antibiotiques, les infections digestives, la chaîne du froid, l'alimentation, ont été envisagés pour expliquer l'émergence des MICI dans les pays développés mais leur réelle implication reste controversée.

II.C.3. Anomalies épithéliales et facteurs immunologiques

Des anomalies épithéliales ont été investiguées dans la physiopathologie des MICI et notamment de la RCH. Il a été décrit une dysfonction des cellules caliciformes qui produisent le mucus et qui sont aussi capables de présenter des antigènes alimentaires aux cellules dendritiques, et donc d'influencer les réponses immunitaires[62](figure 2). Des données chez les patients atteints de RCH et dans des modèles murins ont permis de mettre en évidence que des anomalies du stress du réticulum endoplasmique expliquaient en grande partie cette dysfonction des cellules caliciformes. En effet, Treton *et al* ont mis en évidence un défaut du stress du réticulum endoplasmique dans la muqueuse colique des patients atteints de RCH[63]. Par ailleurs, ils ont développé un modèle murin double KO IL10 (dysfonction immune) et Nox1 (anomalies épithéliales) conduisant au développement d'une colite RCH like avec les mêmes complications (cancer colorectal notamment). Ce modèle murin présente des anomalies importantes du stress du réticulum endoplasmique[64].

Au niveau épithélial, l'altération de la barrière intestinale avec une augmentation de la perméabilité joue un rôle important, notamment dans la maladie de Crohn[65] (figure 2). Ce phénomène appelé « leaky gut » semble être très précoce dans la physiopathologie de la maladie de Crohn[66]. En effet, il a été décrit chez des apparentés au 1^{er} degré de patients atteints de maladie de Crohn sans symptômes cliniques[67]. Enfin, les mutations du gène NOD2 ont été associées à une augmentation de la perméabilité épithéliale. Cette altération laisse passer les antigènes et produits bactériens qui activent en retour la réponse immune. Par ailleurs, certaines cytokines inflammatoires augmentent en retour la perméabilité intestinale entraînant un cercle vicieux entre inflammation et altération de la fonction de barrière.

En lien étroit avec l'altération de la perméabilité intestinale, il a été observé une dysfonction des cellules de Paneth impliquées dans l'immunité innée et une diminution de la production des défensines par ces cellules [68] (figure 2). La cause de ces anomalies est mal connue et probablement multifactorielle. En effet, plusieurs mutations génétiques identifiées dans la maladie de Crohn, et touchant des fonctions biologiques différentes (NOD2, autophagie, stress du réticulum endoplasmique, etc.), sont toutes capables d'induire ces dysfonctions des cellules de Paneth[69,70].

La régulation de l'autophagie est une des fonctions clés de l'immunité innée dont l'altération est suggérée par les études génétiques[71] (figure 2). L'autophagie est une fonction quasi-ubiquitaire, qui permet aux cellules de recycler ou dégrader des composants intracellulaires, en générant des vacuoles intracellulaires les conduisant vers une dégradation par les lysosomes. Elle permet notamment la dégradation des pathogènes intracellulaires et la présentation des antigènes au

système immunitaire adaptatif. Sur des modèles animaux chez lesquels l'autophagie était altérée génétiquement, on a pu constater qu'il existe une moindre résistance aux infections digestives, un excès des réponses inflammatoires intestinales et des anomalies fonctionnelles des cellules de Paneth[72].

Des anomalies plus tardives que celles de l'immunité innée, du profil immunologique ont été bien décrites au cours des MICI et ont été à l'origine de l'utilisation des différents traitements par corticoïdes, immunosuppresseurs et biologiques dont les anti-TNF. La dynamique des réponses immunes est complexe cependant les éléments suivants ont été mis en évidence : production de médiateurs inflammatoires de type cytokines et chimiokines (IL1 β , IL6, TNF α , IL12, IFN γ ...), déséquilibre entre cellules effectrices (voie Th17) et régulatrices (T reg)[73] et recrutement de nouvelles cellules inflammatoires sanguines *via* la surexpression de molécules d'adhésion (figure 2). Cette dernière constatation a conduit à l'utilisation avec efficacité des anti-intégrines notamment dans la RCH[74].

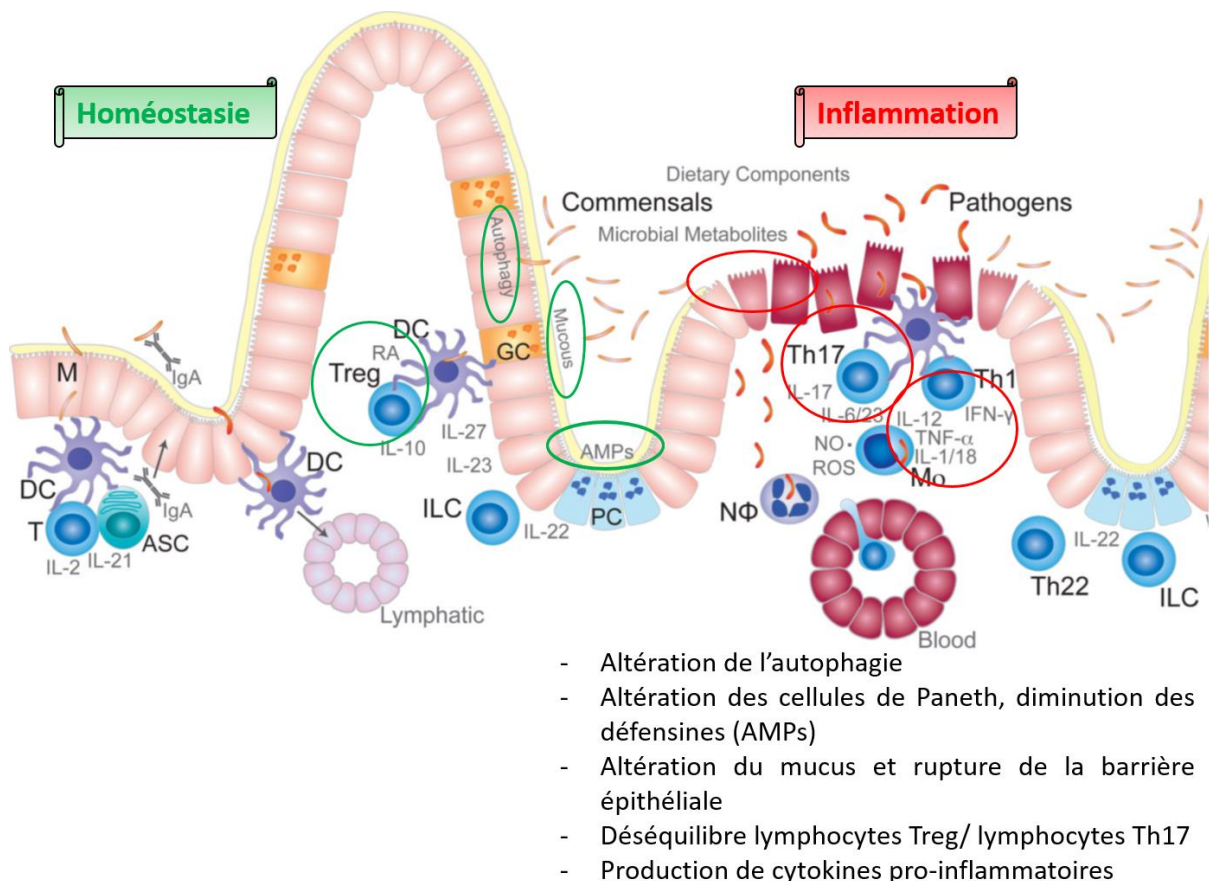


Figure 2. Schéma des facteurs épithéliaux et immuns impliqués dans la physiopathologie des MICI
D'après Graham *et al* [55]

II.C.4. Rôle du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal joue un rôle central dans la physiopathologie des MICI. En effet, sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux, le microbiote intestinal interagit étroitement avec le système immunitaire.

La topographie des lésions constitue l'un des premiers éléments évoqués pour impliquer le microbiote dans la pathogénie des MICI. En effet, les zones à forte concentration en microorganismes (10^{11} to 10^{12} bactéries par gramme), l'iléon distal et le colon sont préférentiellement atteints[75]. Dans les années 80, une équipe d'Oxford a observé que la dérivation du flux luminal permettait une cicatrisation des lésions sous-jacentes chez les patients atteints de maladie de Crohn [76]. La réintroduction de l'effluent provenant de l'intestin grêle dans le côlon de patients atteints de MC traités par chirurgie avec iléostomie et colostomie induisait une inflammation dans le côlon. Inversement, l'ultrafiltrat de ce chyme, ne contenant pas de bactéries n'avait pas cet effet pro-inflammatoire. Dans la même idée, l'équipe de Rutgeerts a montré qu'après résection de l'iléon terminal, la récurrence survenait chez 70 % des patients dans les six mois après rétablissement de la continuité digestive et ne s'observait pas chez les malades ayant une iléostomie (63). Cette récurrence survient préférentiellement au niveau de l'anastomose ou du segment intestinal d'amont.

De plus, les données issues des modèles murins confirment le rôle indispensable du microbiote intestinal. La présence du microbiote est indispensable dans les différents modèles murins de colite, spontanée (IL10 ou IL12 KO)[75,77] ou chimique[77]. En effet, les souris axéniques (sans microbiote) ne développent pas de colite. Par ailleurs, sur un autre modèle de colite, Garrett *et al* ont montré que le microbiote d'un autre modèle murin de colite spontanée pouvait transmettre la colite à des souris sauvages, introduisant le concept de microbiote colitogène[78].

Les études génétiques ont mis en évidence l'importance de l'immunité innée et donc de l'interaction entre le microbiote intestinal et le système immunitaire[79], en commençant par NOD 2.

En outre, plusieurs facteurs environnementaux impliqués dans le développement des MICI peuvent influencer le microbiote intestinal. Il a bien été décrit que les antibiotiques modifiaient le microbiote intestinal[17] et l'intrication entre alimentation et microbiote paraît intuitive[80]. De façon plus originale, il a été mis en évidence que le statut tabagique modifiait le microbiote[81].

Si l'on revient aux jumeaux monozygotes et dizygotes, il existe des paires concordantes ou discordantes concernant le diagnostic de MICI. Cette constatation met en évidence que la

prédisposition génétique n'est pas suffisante pour expliquer le développement d'une MICI. Plusieurs études se sont intéressées au microbiote fécal et associé aux muqueuses des jumeaux notamment discordants, ceci permettant de « séparer » la part génétique et environnementale[82–84]. Ces études montrent que l'effet du phénotype (MICI ou adulte sain) est plus fort sur le microbiote intestinal que la part génétique[84].

Ainsi, chez un sujet génétiquement prédisposé et sous l'influence de facteurs environnementaux, les MICI résultent d'une réponse inflammatoire inappropriée provoquée par un déséquilibre du microbiote intestinal ou dysbiose.

III. DYSBIOSE AU COURS DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES

III.A. Description de la dysbiose

Des études moléculaires, indépendantes de la culture, basées pour la plupart sur le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, ont permis de caractériser les anomalies du microbiote intestinal au cours des MICI. Ces anomalies sont (i) une forte instabilité du microbiote au cours du temps, (ii) la présence d'environ 30 % de bactéries inhabituelles, (iii) une restriction de la biodiversité généralement aux dépens du phylum des Firmicutes, et (iv) une augmentation de la concentration bactérienne dans la muqueuse[85,86]. Cette dysbiose existe dans la RCH mais elle est plus marquée chez les patients atteints de maladie de Crohn[87] (figure 3). Le déficit en Firmicutes concerne principalement le groupe *Clostridium leptum* qui comprend plusieurs bactéries productrices de butyrate. Parmi elles, la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii* est spécifiquement diminuée[88] ainsi que *Roseburia*, *Lachnospiraceae*... Au contraire, il y a une augmentation des protéobactéries, ainsi que de *Fusobacterium* et *Ruminococcus gnavus*[6]. De plus, une augmentation de certains pathogènes tels que *Escherichia coli* adhérent-invasif (AIEC) [89] ou *Mycobacterium avium paratuberculosis* a été bien décrite[90,91]. Des études le plus souvent pédiatriques ont mis en évidence que ces altérations du microbiote intestinal sont précoces[92].

En comparant le profil du microbiote intestinal obtenu par qPCR sur les selles de patients atteints de MICI la dysbiose, et particulièrement le déficit en *Faecalibacterium prausnitzii*, semble plus marquée chez les patients en poussée par rapport à ceux en rémission. Cette observation nous incite à penser qu'une dysbiose plus marquée pourrait être prédictive de rechute. Récemment, une étude microbiologique, insérée dans la cohorte STORI du GETAID, a permis de mettre en évidence la dysbiose comme facteur prédictif de récurrence clinique après arrêt du traitement par infliximab au cours d'une maladie de Crohn bien contrôlée. Ces travaux mettent en évidence une dysbiose au plus marquée chez les futurs rechuteurs avant même l'arrêt du traitement par infliximab. La quantité de

bactéries appartenant aux groupes *Clostridium coccoïdes* et *Bacteroides* (et apparentés) ainsi que la prévalence de l'espèce *F. prausnitzii* dans les selles permet de discriminer les patients qui resteront en rémission des futurs rechuteurs[8]. Cette étude confirme les résultats obtenu dans un contexte post-opératoire[7].

De nombreuses études décrivent de façon précise la dysbiose associée aux MICI. L'intérêt a ensuite été porté sur les conséquences de cette dysbiose au niveau fonctionnel et sur les voies de l'inflammation.

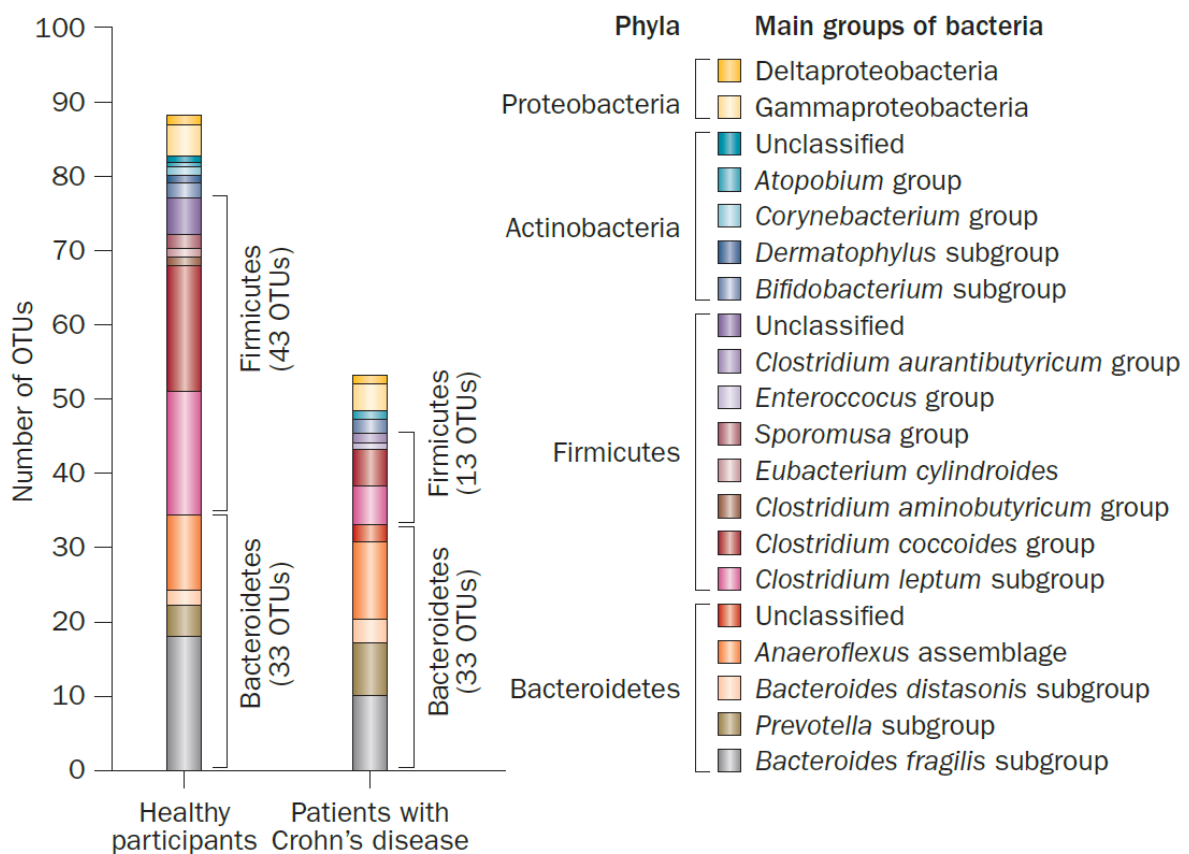


Figure 3. Dysbiose dans la maladie de Crohn par rapport aux volontaires sains

D'après Manichanh *et al* [5]

III.B. Interactions hôte-bactéries

III.B.1. Rôle de certaines bactéries commensales sur l'inflammation intestinale

Le microbiote intestinal est indispensable à la maturation du système immunitaire et joue un rôle de barrière contre l'infection par des micro-organismes pathogènes. Le microbiote commensal peut dans ce cadre influencer le système immunitaire de l'hôte. En manipulant le microbiote intestinal de souris, Atarashi *et al* ont mis en évidence que la présence de lymphocytes Treg exprimant Foxp3

(forkhead box P3) dans le colon était dépendante et inductible par le microbiote intestinal. Ils ont identifié les bactéries du groupe *Clostridium* comme étant capable d'induire ces Treg coliques producteurs d'IL10[23]. Toujours sur un modèle murin, à partir d'un échantillon fécal humain ont été identifiées 17 souches, des clusters IV, XIVa et XVIII des Clostridia, capables d'induire les Treg coliques chez la souris. De plus, l'administration de ces souches diminuait l'intensité des colites induites chimiquement (TNBS) et allergiques[93]. Finalement, ce sont les acides gras à chaînes courtes, produit par les Clostridia qui ont été identifiés comme responsables de l'augmentation des Treg coliques et exerçant un effet protecteur vis-à-vis de l'inflammation intestinale *in vivo*[24].

Dans un modèle de récurrence post opératoire, une proportion faible de *Faecalibacterium prausnitzii* sur la muqueuse iléale réséquée est associée à la récurrence endoscopique à 6 mois. Il a été alors montré que le surnageant de *Faecalibacterium prausnitzii* diminuait la réponse inflammatoire *in vitro* des cellules Caco-2 transfectées avec un gène rapporteur NFκB. Cette unique espèce bactérienne diminuait aussi la réponse inflammatoire sur des PBMC (peripheral blood mononuclear cell). *In vivo*, à la fois *Faecalibacterium prausnitzii* vivant ou son surnageant réduit la sévérité de la colite au TNBS en tendant à corriger la dysbiose[7]. Par ailleurs, dans une autre étude *Faecalibacterium prausnitzii* est capable d'induire un sous-type de lymphocytes Treg CD4CD8αα aux fonctions régulatrices[94]. Une autre bactérie commensale intestinale *Bacteroides fragilis* a également été décrite comme capable d'induire les lymphocytes Treg[95].

De façon opposée, les bactéries commensales considérées comme des pathobiontes, et parmi elles *Escherichia coli* AIEC induisent la sécrétion d'IFNγ et de Th17[96]. Par ailleurs, AIEC est également capable d'inhiber le processus d'autophagie dans les cellules épithéliales[97].

Pour aller plus loin dans la compréhension du dialogue hôte-bactéries commensales intestinales, le rôle des métabolites bactériens ou des molécules de l'hôte modifiées par les bactéries, dans la régulation de la réponse inflammatoire et donc dans les MICI, a été investigué.

III.B.2. Rôle des métabolites bactériens

Duboc *et al* ont montré que la dysbiose associée aux MICI conduisait à un défaut du métabolisme des acides biliaires[9]. Ces travaux ont mis en évidence des anomalies du pool d'acides biliaires fécal et sérique chez des patients atteints de MICI coliques (comparé à des témoins), correspondant à un déficit de la déconjugaison et de la transformation des acides biliaires par le microbiote intestinal. Il a été montré par ailleurs une augmentation des acides biliaires sulfatés au cours des MICI. Des expériences conduites sur le modèle de cellule épithéliale Caco-2 ont permis de mettre en évidence

l'effet anti-inflammatoire des acides biliaires secondaires (figure 4). En revanche, ces propriétés anti-inflammatoires étaient abolies par la sulfatation de ces acides biliaires secondaires[9].

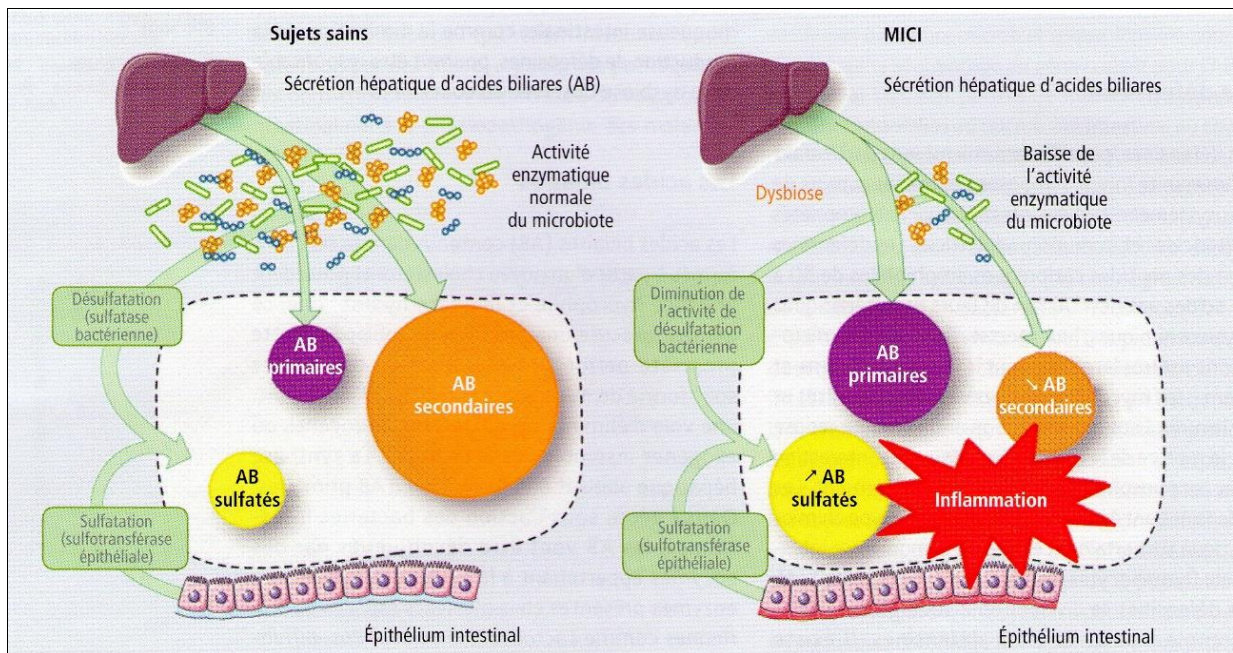


Figure 4. Dismétabolisme des acides biliaires au cours des MICI

D'après Duboc *et al*[9]

Dans une stratégie inverse d'identification des métabolites responsables de l'activité anti-inflammatoire des bactéries commensales, les acides gras à chaîne courte ont été identifiés, comme décrit précédemment. Concernant *Faecalibacterium prausnitzii*, l'identification des composés bactériens responsables de son activité anti-inflammatoire a fait l'objet de recherches approfondies. Un fractionnement bioguidé du surnageant de *Faecalibacterium prausnitzii* a permis d'attribuer l'activité anti-inflammatoire à une protéine bactérienne de 15 kDa, la protéine MAM, et à 7 peptides issus de cette protéine[10]. En effet, la transfection dans du gène codant la protéine MAM dans des cellules épithéliales et rénales, également transfectées avec un gène rapporteur NFκB, a permis de mettre en évidence son effet anti-inflammatoire *in vitro*. *In vivo*, sa délivrance via *Lactococcus lactis* dans un modèle murin de colite chimique au TNBS a confirmé cet effet. La protéine MAM a ensuite été mise en évidence *in vivo* dans des échantillons de selles[98].

Des stratégies ciblées motivées par des observations lors d'études translationnelles mais également des études métabolomiques plus larges, permettront d'identifier d'autres métabolites bactériens impliqués dans la modulation de l'inflammation chez l'hôte et par conséquent dans la physiopathologie des MICI.

III.C. Pistes de traitement impliquant la manipulation du microbiote intestinal

III.C.1. Transplantation de microbiote fécal

La transplantation de microbiote fécal a montré des résultats frappants en cas d'infections récurrentes par *Clostridium difficile* avec une efficacité de 90%[99]. Dans le cas de la rectocolite hémorragique (RCH), plusieurs essais randomisés contrôlés ont montré des résultats prometteurs avec un effet donneur[100,101]. Dans le cas de la maladie de Crohn, les études sont encore trop limitées en terme de nombre de patients pour livrer des résultats interprétables[102,103] mais une étude randomisée contrôlée française devrait prochainement apporter de nouveaux éléments.

III.C.2. L'utilisation des antibiotiques et des probiotiques

Les antibiotiques ont montré leur efficacité majoritairement dans le traitement des complications des MICI et dans quelques situations cliniques particulières, comme la prévention de la récurrence post-opératoire mais surtout dans les pochites. Cependant, des considérations écologiques ont limité leur usage à long terme[104].

Par définition, les probiotiques sont des micro-organismes vivants, non pathogènes, qui lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, impactent positivement sur la santé de l'hôte. Les effets bénéfiques apportés par les probiotiques peuvent être : une normalisation de la perméabilité membranaire, un retour à un état de normobiose ou encore une régulation négative de la réponse intestinale pro-inflammatoire. Plusieurs études ont déjà montré l'efficacité des probiotiques dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : ainsi par exemple, la souche *E. coli* Nissle 1917 présente une efficacité similaire à celle d'anti-inflammatoires de synthèse tels que la mesalazine dans le maintien en rémission de la RCH[105]. Mais les résultats les plus probants ont été obtenus au cours de la pochite. Le probiotique VSL#3, contenant un mélange de plusieurs souches a prouvé son efficacité dans la prévention de la rechute au cours de plusieurs études[106]. Néanmoins, à ce jour, les preuves de l'efficacité des probiotiques dans le maintien en rémission et de la prévention des rechutes en post opératoire dans les cas de MC, restent peu nombreuses et surtout contradictoires.

Ces stratégies thérapeutiques de manipulation du microbiote intestinale restent encore peu ciblées. Les avancées en recherche fondamentale visent à identifier les métabolites bactériens impliqués dans la modulation de l'inflammation et le dialogue hôte-bactéries commensales, et ceci dans l'optique d'utiliser à terme ces métabolites comme thérapeutiques au cours des MICI.

IV. LE QUORUM SENSING

IV.A. Définition du quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication inter bactérienne qui repose sur la production, la sécrétion et la détection de petites molécules diffusibles dites auto-inductrices (AI) en réponse à un changement de densité bactérienne. Ces molécules « signal » s'accumulent pendant la croissance bactérienne. A partir d'une certaine densité bactérienne que l'on nomme le quorum, une concentration seuil de molécules « signal » est atteinte. Elles jouent alors le rôle de régulateur transcriptionnel. Cela induit l'expression de certains gènes impliqués par exemple dans l'accès aux nutriments, la croissance bactérienne (biofilms, surfactant...), la virulence et la défense contre d'autres micro-organismes (production de peptides antimicrobiens) (figure 5). Ces changements phénotypiques permettent une adaptation à l'environnement et/ou une coordination entre cellules bactériennes dans une population conduisant à un comportement collectif. Coûteux et improductifs à l'échelle individuelle, ils deviennent rentables à l'échelle du groupe. La transcription des gènes impliqués dans la synthèse et la reconnaissance des molécules « signal » est également activée, permettant un rétrocontrôle positif.

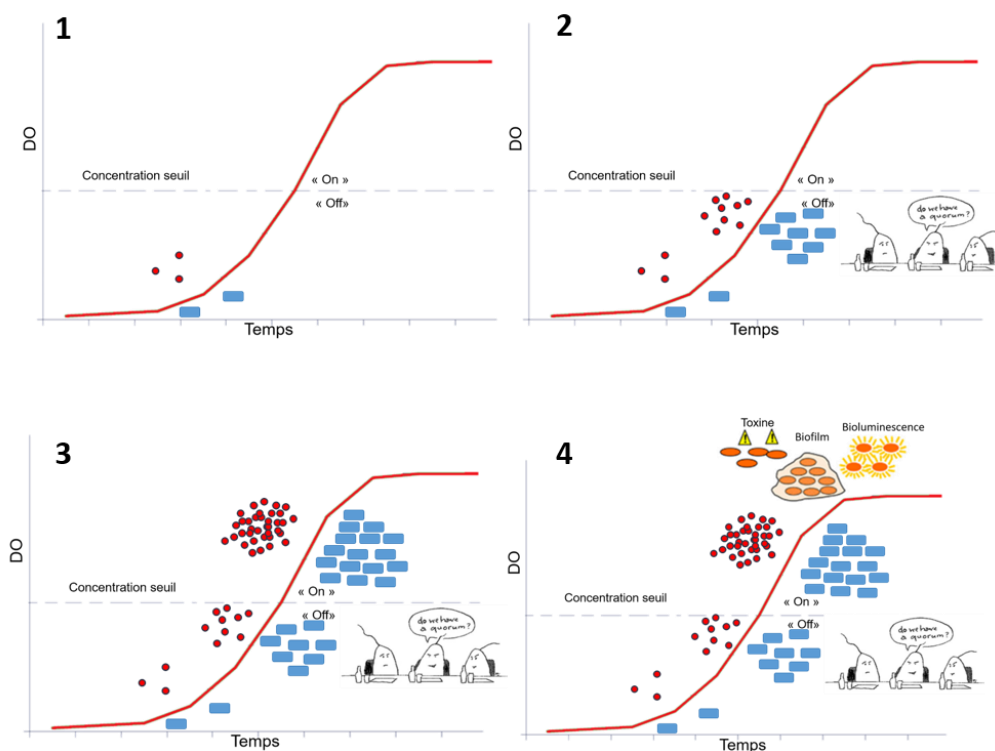


Figure 5 : Le quorum sensing

La découverte de cette capacité des bactéries à percevoir la densité bactérienne et à moduler son phénotype en conséquence a changé notre vision des procaryotes. Considérés auparavant comme des organismes unicellulaires indépendants, il a été mis en évidence il y a une trentaine d'années que

les bactéries pouvaient avoir des interactions « sociales » et des comportements proches des organismes multicellulaires. Cette découverte a été faite chez *Vibrio fischeri* par Hastings en 1970 [107]. Cette bactérie marine ne produit pas de lumière lorsqu'elle est dans l'océan. Elle participe en revanche à une relation symbiotique avec plusieurs organismes eucaryotes marins. Dans ce cas, l'hôte fournit un milieu riche en nutriments et *Vibrio fischeri* devient bioluminescent, permettant par exemple à l'hôte d'échapper aux prédateurs. Hastings *et al* ont observé que ces bactéries devenaient bioluminescentes seulement lorsque la densité bactérienne était élevée (comme dans l'organe lumineux de l'hôte). La bioluminescence était également induite par l'ajout du surnageant de culture. Cette substance extracellulaire qui induit l'expression de la luciférase et par conséquent la bioluminescence a été ensuite identifiée comme une N-acyl-homosérine lactone (AHL), plus précisément 3-oxo-C6-HSL[108]. Ce n'est qu'en 1994 que Fuqua *et al* ont introduit le terme « quorum sensing » pour décrire ce phénomène[109]. Depuis, le nombre de publications sur le QS a augmenté de façon exponentielle et plusieurs systèmes de communication ont été décrits en fonction du type de molécule signal et de système de détection.

IV.B. Quorum sensing impliquant les N-acyl homosérine lactones

Le premier type de QS décrit et le mieux étudié à ce jour est celui utilisé majoritairement par les bactéries Gram négatif et dont la molécule signal est une N-acyl-homosérine lactone.

IV.B.1. Les N-acyl homosérine lactones

Les N-acyl-homosérine lactones (AHLs) sont des molécules amphiphiles composée d'un noyau lactone (hydrophile) et d'une chaîne carbonée (hydrophobe). Les différentes AHLs produites sont variables en termes de longueur de la chaîne carbonée (4-18 carbones), de substitution en position β (non substitué, groupement hydroxyl : OH ou groupement carboxyl : oxo) et de degré de saturation de la chaîne carbonée (figure 6). Leur caractère amphiphile leur permet de diffuser librement à travers les membranes cellulaires et dans le milieu extracellulaire.

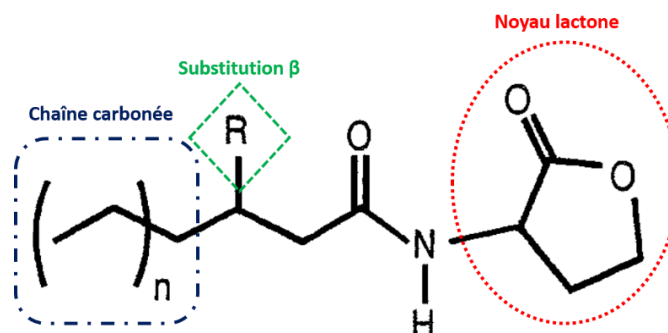


Figure 6: Structure chimique des AHLs R= aucune substitution, OH ou oxo

D'après Fuqua *et al* [110]

IV.B.2. Systèmes de type LuxI/LuxR

Le fonctionnement du QS impliquant les AHLs peut être expliqué en utilisant comme exemple le système LuxI/LuxR de la bactérie marine bioluminescente *Vibrio fischeri* qui a été le premier décrit. La protéine LuxI (synthase) est une enzyme qui permet la biosynthèse de l'AHL, à partir de la S-adénosyl-méthionine (SAM) et d'une protéine porteuse d'acide gras (acyl-acyl carrier protein ou ACP). Les AHLs diffusent librement et s'accumulent dans le milieu extracellulaire. Lorsque le quorum est atteint, la concentration d'AHLs dépasse un seuil. Les AHLs se fixent alors sur leur récepteur intrabactérien LuxR conduisant à la dimérisation de ce dernier qui agit alors comme régulateur transcriptionnel (figure 7). Il active la transcription des gènes de la bioluminescence en se fixant sur l'opéron luxICDABE mais également la transcription des gènes de LuxI et LuxR effectuant ainsi un rétrocontrôle positif ou auto-induction[111].

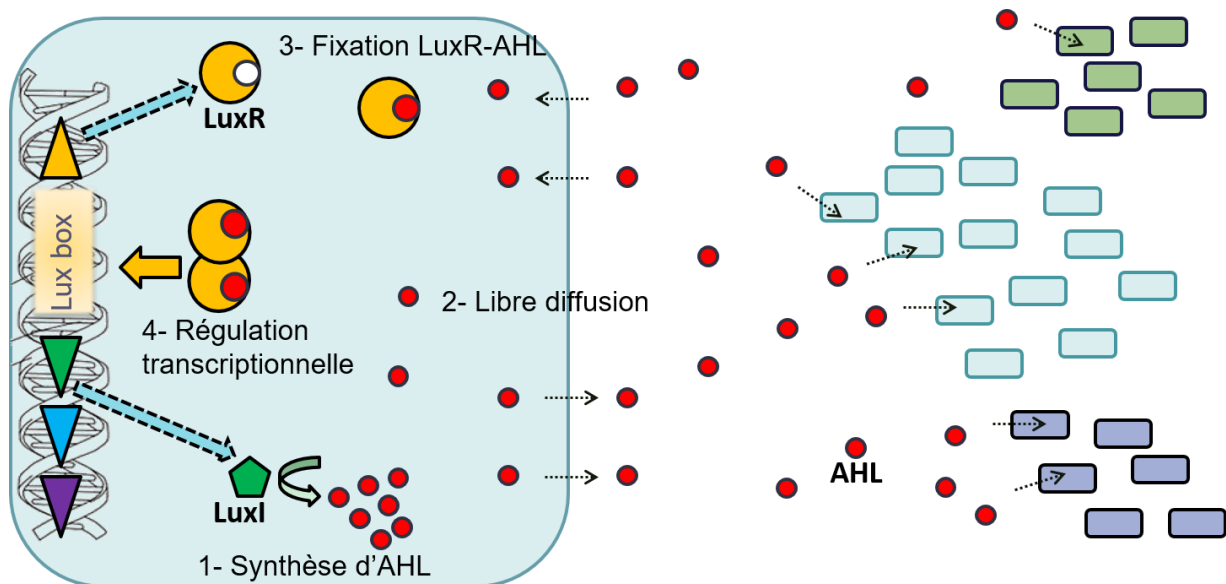


Figure 7 : Quorum sensing impliquant les AHLs, exemple du système LuxI/LuxR de *Vibrio fischeri*

Depuis la description du système LuxI/LuxR, de nombreuses études ont décrit la production d'AHLs chez différentes bactéries Gram négatif avec un ou plusieurs couples synthase de la famille LuxI (notée XxxI)/récepteur de la famille LuxR (noté XxxR) et leur(s) AHL(s) correspondante(s)[111–113]. Le tableau 2 répertorie ces études de façon non exhaustive.

Organisme	AHL(s)	Système type LuxI/LuxR	Phénotype contrôlé	Ref
<i>Acidovorax radicans</i> N35	3-OH-C10-HSL	AraI/AraR	colonisation des racines	[114]
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C4-HSL	AhyI/AhyR	biofilms, exoprotéases	[115]
<i>Aeromonas salmonicida</i>	C4-HSL	AsaI/AsaR	exoprotéase	[116]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3-oxo-C8-HSL	Tral/TraR	conjugaison	[117]
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	C6-HSL, C8-HSL	CepI/CepR, CciI/CciR	exoenzymes, biofilm, mobilité, siderophore, virulence	[118]

<i>Burkholderia pseudomallei</i>	C8-HSL, C10-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-OH-C10-HSL, 3-OH-C14-HSL	PmlI1/ PmlIR1, PmlI2/ BpmR2, PmlI3/ BpmR3	virulence, exoprotease	[119]
<i>Burkholderia mallei</i>	C8-HSL, C10-HSL	Bmal1/BmaR1, Bmal3/BmaR3, BmaR4, BmaR5	virulence	[120]
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	C6-HSL, C8-HSL; C10-HSL; C12-HSL; 3-oxo-C10-HSL	CepI/CepR, Bvii/BviR	inconnu	[121]
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C6-HSL	Cvii /CviR	exoenzymes, cyanide, pigment	[122]
<i>Cedecea neteri</i>	C4-HSL	Cnel/CneR	inconnu	[123]
<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	3-oxo-C6-HSL	(ExpI)/ExpR, CarI/CarR	carbapénème, exoenzymes, virulence	[124]
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3-oxo-C6-HSL	ExpI/ExpR	pectinase	[125]
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	C10-HSL, C10:1-HSL	Nwii/NwiR	inconnu	[126]
<i>Pandoraea pnomenusa</i> RB38	C8-HSL	Ppni/PpnR1, R2	inconnu	[127]
<i>Pantoea (Erwinia) stewartii</i>	3-oxo-C6-HSL	EsaI/EsaR	exopolysaccharide	[128]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4-HSL, 3-oxo-C12-HSL	LasI/LasR, RhlI/RhlR, QscR, VqsR	exoenzymes, sécrétion, HCN, biofilms	[129]
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	C6-HSL	PhzI/PhzR, CsaI/CsaR	phenazines, protease, agrégation...	[130]
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	C10-HSL, C12-HSL ; 3-oxo-HSLs à longue chaîne	Pfsl/PfsR, PfvI/PfvR	inconnu	[131]
<i>Pseudomonas putida</i>	3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL	Ppul/PpuR	biofilm	[132]
<i>Ralstonia solanacearum</i>	C6-HSL, C8-HSL	SolI/SolR	inconnu	[133]
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	AHLs courtes chaînes, 3-OH AHL à longue chaîne	RaiI/RaiR, CinI/CinR	Nodulation, inhibition de la croissance, fixation N2	[134]
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i>	7-cis-C14-HSL/C6-HSL/ C7-HSL/C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-OH-C8-HSL	CinI/CinR, RhlI/RhlR, RaiI/RaiR, TraR, BisR, TriR	symbiose, transfert de plasmide, inhibition de la croissance ...	[135–137]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	7-cis-C14-HSL	CerI/CerR	agrégation	[138]
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	C4-HSL	SwrI/SwrR	mobilité, exoprotease, biofilm, biosurfactant	[139]
<i>Serratia marcescens</i> SS-1	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL	SpnI/SpnR	mobilité, surfactant, pigment...	[140]
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	C8-HSL, C12-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-oxo-C16:1-HSL, C16:1-HSL, C18-HSL	SinI/SinR, ExpR, TraR	nodulation/symbiose	[141–143]
<i>Vibrio anguillarum</i>	3-oxo-C10-HSL	VanI/VanR	inconnu	[144]
<i>Vibrio fischeri</i>	3-oxo-C6-HSL	LuxI/LuxR	bioluminescence	[145]
<i>Yersinia enterocolitica</i>	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C14-HSL	YenI/YenR, YenR2	mobilité	[146]
<i>Yersinia pestis</i> KIM61	3oxo-C6-HSL; 3oxo-C8-HSL	YspI/YspR, Ypel/YpeR	inconnu	[147]
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C8-HSL	YpsI/YpsR, Ytbl/YtbR	mobilité, agrégation	[148]

Tableau 2. Les différentes bactéries productrices d'AHLs

IV.B.3. Méthodes de détection des AHLs

La découverte de nouvelles bactéries productrices d'AHLs repose sur la mise en évidence de ces molécules (majoritairement à partir d'un milieu de culture). Les 2 méthodes majeures de détection qui ont été utilisées sont les biosenseurs ou systèmes rapporteurs bactériens et la spectrométrie de masse.

IV.B.3.a. Les biosenseurs ou systèmes rapporteurs bactériens :

Les biosenseurs reposent sur la détection de l'activité biologique AHL sur un récepteur de type LuxR. Plusieurs systèmes rapporteurs bactériens différents ont été construits, chacun présente les caractéristiques communes suivantes[149] permettant *in fine* de détecter la présence d'AHLs exogènes :

- Il s'agit d'une bactérie qui ne produit pas d'AHL pour éviter l'auto-activation. Soit une bactérie sans analogue de LuxI est choisie (*Escherichia coli* par exemple), soit la bactérie choisie possède un système LuxI/LuxR (*Chromobacterium violaceum* ou *Agrobacterium tumefaciens* par exemple) et le gène LuxI est alors désactivé.
- Elle possède un récepteur de type LuxR, soit naturellement, soit *via* un plasmide (biosenseurs *Escherichia coli*).
- Elle possède un promoteur qui est la cible de LuxR couplé à l'AHL en amont d'un gène rapporteur colorimétrique ou bioluminescent. Encore une fois plusieurs cas de figure sont possibles. *Chromobacterium violaceum* possède naturellement un promoteur (cible de CvR) couplé au gène de la violacéine (réponse colorimétrique). *Agrobacterium tumefaciens* possède un récepteur type LuxR (TraR) mais le promoteur cible de TraR n'induit pas de changement colorimétrique, il a donc été fusionné avec le gène de la β -galactosidase qui induit une coloration bleutée en présence de X-gal (figure 8) (souche NTL4). Enfin, plusieurs biosenseurs ont été construits en utilisant un *Escherichia coli* dans lequel un plasmide senseur construit en fusionnant un promoteur cible de l'analogue LuxR avec un gène rapporteur le plus souvent induisant la bioluminescence (luxCDABE).

Les concentrations et le type d'AHLs détectés dépendent de la sensibilité du récepteur de type LuxR et de l'éventail d'AHLs qu'il reconnaît.

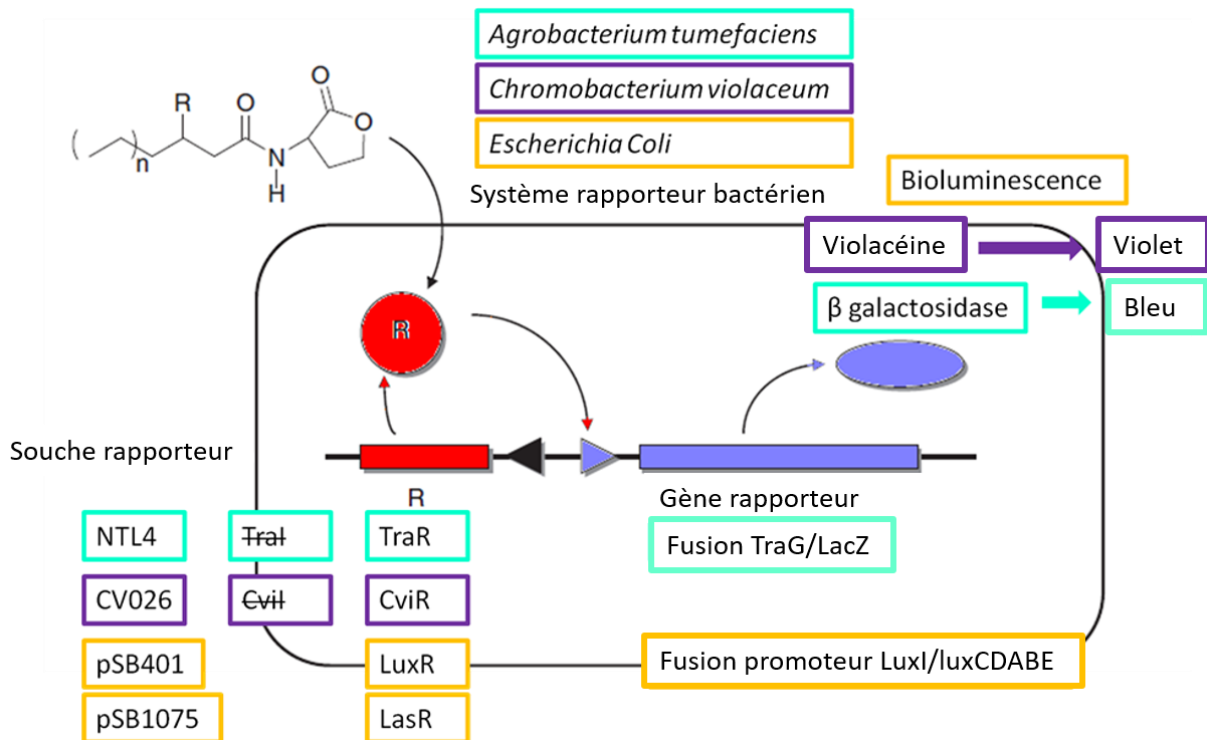


Figure 8. Construction des systèmes rapporteurs

D'après Steindler et al, 2007 [149]

L'avantage des systèmes rapporteurs bactériens est qu'ils sont relativement sensibles et spécifiques puisqu'ils détectent l'activité biologique des AHLs. Mais ils ont plusieurs inconvénients. Ils ne permettent pas d'identifier précisément la ou les AHLs détectées, au mieux peut-on savoir s'il s'agit d'une AHL à courte ou longue chaîne (10-18 carbonés). La réponse est semi-quantitative mais dépend de l'affinité entre l'AHL et le récepteur et ne permet donc en aucun cas d'évaluer la concentration de ou des AHL(s) détectée(s).

IV.B.3.b. La spectrométrie de masse :

L'utilisation de la spectrométrie de masse s'est rapidement développée pour la détection des AHLs. Même si l'électrophorèse capillaire ou la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont d'abord été utilisées[150,151], c'est la spectrométrie de masse couplée à l'HPLC (high performance liquid chromatography) qui s'est avéré être la plus fiable et la plus utilisée[152]. L'HPLC en phase inverse permet une séparation des AHLs en fonction de leur degré d'hydrophobicité. Le temps de rétention dépend donc de la longueur de la chaîne carbonée, de la substitution et de la présence ou non d'insaturations[153,154]. L'AHL est ensuite fragmentée dans la cellule de collision du spectromètre de masse. Le mécanisme de fragmentation a été bien décrit dans plusieurs études portant à la fois sur des molécules standards et des AHLs identifiées dans des surnageants bactérien[154–157]. Cette fragmentation spécifique de l'ion parent $[M+H]^+$ au niveau de la liaison

amine peut se faire de deux manières : soit la charge est portée par le noyau lactone avec un fragment m/z 102, soit la chaîne carbonée est chargée avec un fragment $[M+H-101]^+$ appelé perte de neutre (figure 9). L' AHL peut être ainsi détectée en spectrométrie de masse couplée à l' HPLC par la présence des 2 ions produits possibles (m/z 102 et $[M+H-101]^+$) à un temps de rétention compatible.

Le développement de techniques de spectrométrie de masse haute résolution comme les spectromètres FTICR (Fourier-transform ion cyclotron resonance) permettent même de connaître la masse précise des AHLs et donc leur formule brute [154,158,159].

La spectrométrie de masse est donc une méthode sensible et précise permettant de détecter et même d' identifier une grande variété d' AHL en fonction de leur structure chimique.

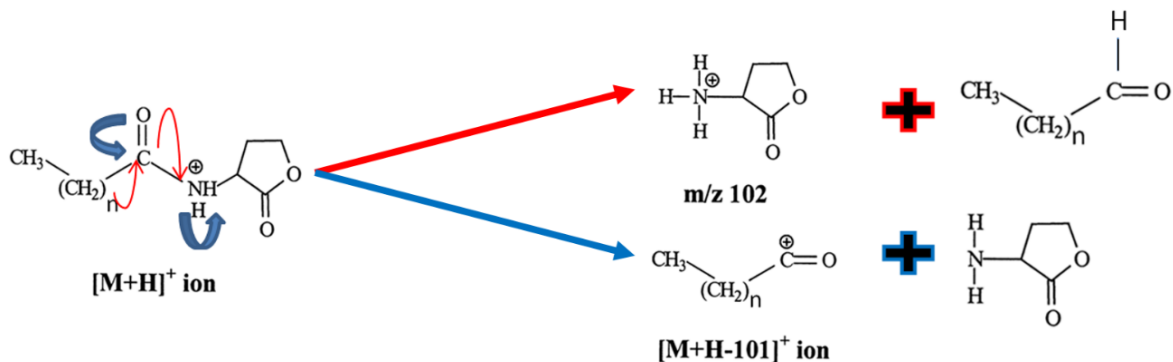


Figure 9. Mécanisme de fragmentation en spectrométrie de masse d' une AHL

D' après Morin *et al* [153]

IV.C. Les autres types de quorum sensing

IV.C.1. Oligopeptides chez les bactéries Gram positif

Les bactéries Gram positif utilisent classiquement comme mode de communication des oligopeptides, linéaires ou cycliques, appelés peptides auto-inducteurs (PAI). Ils sont synthétisés sous la forme de propeptides et subissent des modifications post-transcriptionnelles avant l' exportation du PAI actif hors de la cellule bactérienne. Les PAI sont reconnus par un système à 2 composants : le récepteur transmembranaire histidine kinase (HK) (ou senseur) qui reconnaît le signal et qui active le régulateur de réponse (RR) (ou effecteur) intracytoplasmique. Ce dernier joue alors le rôle de régulateur transcriptionnel induisant la transcription des gènes du PAI, des enzymes impliquées dans la modification post-transcriptionnelle et le transport du PAI, de l' HK et du RR (autoinduction) ainsi que d' autres gènes conduisant à un changement phénotypique (virulence par exemple) [160,161]. L' exemple du système agr décrit chez les staphylocoques illustre ce type de quorum sensing (figure 10).

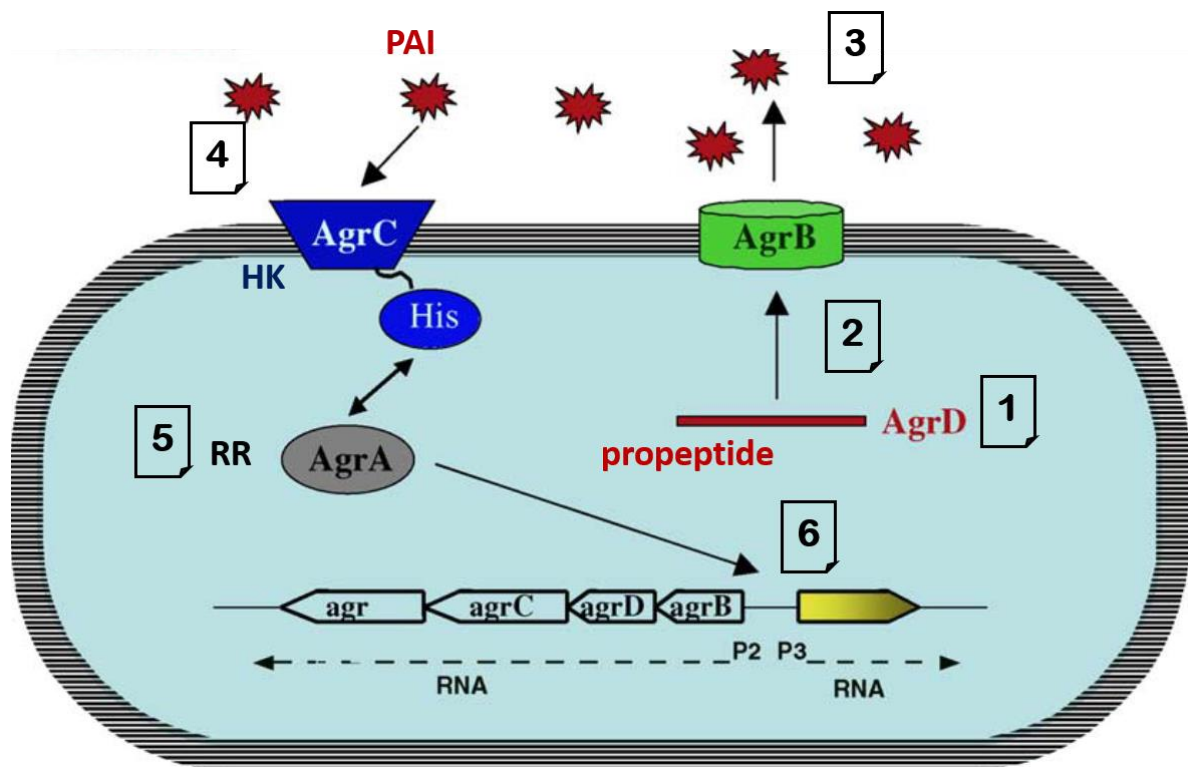


Figure 10. Quorum sensing impliquant les PAI, exemple d'agr

D'après Lyon et Novick[161]

1 : synthèse du propeptide, 2 : modifications post-transcriptionnelles, 3 : sécrétion du PAI, 4 : le PAI est reconnu par son récepteur HK, 5 : activation du RR, 6 : régulation transcriptionnelle

La structure primaire des PAI et leurs modifications post-transcriptionnelles sont très diverses, ce qui implique que ce mode de communication est d'une haute spécificité (souvent à l'échelle de la souche bactérienne comme pour *Staphylocoque aureus*).

IV.C.2. Auto-inducteur 2 (AI-2), le langage universel

Après la découverte du quorum sensing impliquant les AHLs chez *Vibrio fischeri*, c'est chez une autre bactérie bioluminescente, *Vibrio harveyi* que le second type de quorum sensing a été découvert. En effet, en 1979 Greenberg *et al* ont observé que *Vibrio harveyi* devenait bioluminescente après l'ajout d'un surnageant de culture d'autres espèces [162]. Il a ensuite été démontré que des mutants de *Vibrio harveyi* ne produisant pas d'AHLs étaient capables d'activer des gènes dépendants du quorum sensing [163], mettant en évidence l'existence d'un 2^{ème} type de quorum sensing. La molécule « signal » correspondante, dont la structure chimique était alors inconnue a été nommée AI-2. LuxS, le gène responsable de l'activité AI-2 a ensuite été identifié. Il en existe de nombreux homologues (retrouvés chez 537 des 1402 génomes bactériens séquencés)[164]. Finalement, le 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD), une molécule instable, produit dérivé du métabolisme de la S-adenosyl-

méthionine (SAM) (figure 11A) a été reconnu comme responsable de l'activité AI-2. Par des méthodes de cristallisation du couple récepteur-ligand, plusieurs formes de DPD ayant une activité AI-2 ont été décrites selon le récepteur qui le reconnaît [164](figure 11B).

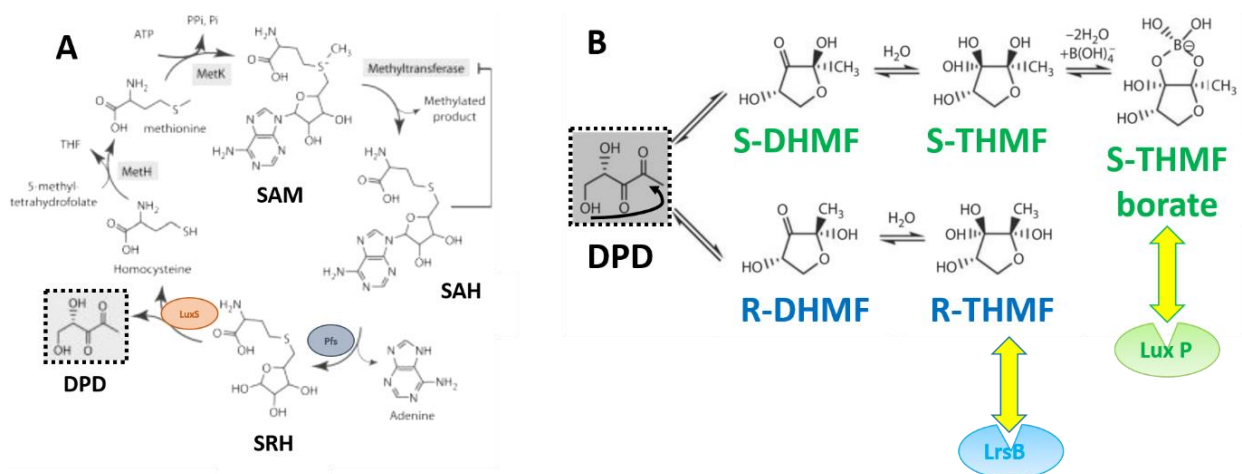


Figure 11. A : synthèse du DPD dans le cycle du métabolisme de la SAM. B : différentes formes d'AI-2 et leur reconnaissance par les récepteur LuxP de *Vibrio harveyi* et LsrB de *Salmonella tiphimurium* D'après Federle [165]

DPD : 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione ; SAH : S-adenosyl homocysteine ; SAM : S-adenosylmethionine ; SRH : S-riboseyl homocysteine ; S-DHMF : S-2,4-dihydroxy-2-méthylhydrofuran-3-one R-DHMF : R-2,4-dihydroxy-2-méthylhydrofuran-3-one ; S-THMF : S-2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran R-THMF : R-2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran

AI-2 après synthèse est transporté activement à travers la membrane et est reconnu par son récepteur qui fait partie d'un système à 2 composants. Si l'on prend l'exemple de *Vibrio harveyi*, AI-2 se fixe au récepteur LuxP qui interagit avec LuxQ. Lux Q agit comme une HK lorsque la concentration d'AI-2 est basse, entraînant une cascade de phosphorylation intracellulaire (LuxU, LuxO) ce qui inhibe LuxR via l'interaction de sRNA avec la protéine chaperon Hfq ce qui déstabilise LuxR. AphA est alors favorisé. Lorsque la concentration d'AI-2 est élevée, LuxQ agit comme une phosphatase, la cascade de phosphorylation est inversée et LuxR est favorisé au dépend d'AphA, induisant par exemple la bioluminescence (figure 12)[164].

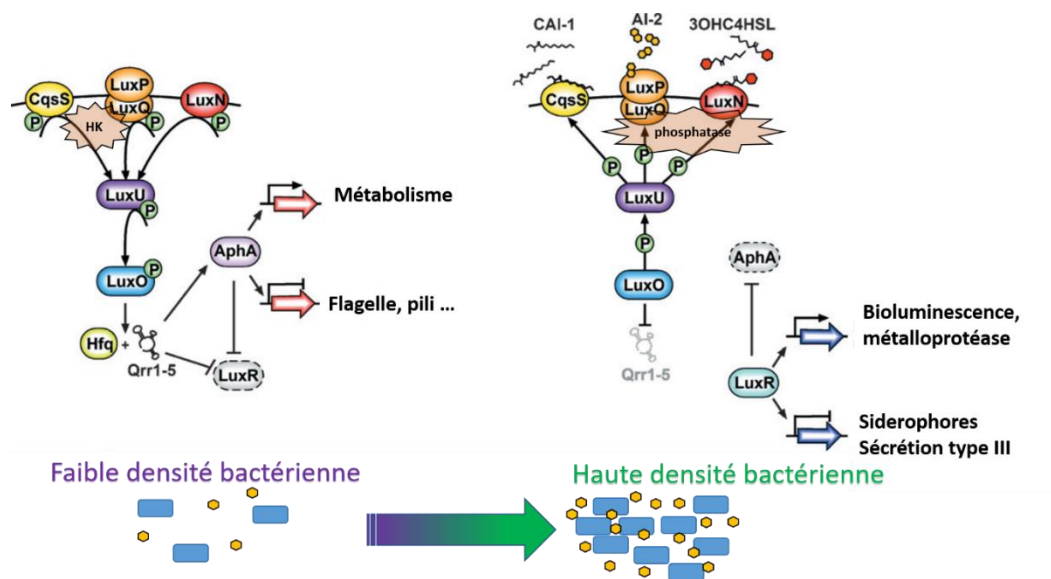


Figure 12. Quorum sensing impliquant AI-2 chez *Vibrio harveyi*

D'après Pereira *et al* [164]

AI-2, même s'il existe sous plusieurs formes est donc un mode de communication très répandu dans le monde bactérien, commun aux bactéries Gram positif et Gram négatif. Favorisant la communication inter-espèces il peut être considéré comme un langage universel, une sorte d'« Esperanto » bactérien[166]. Il permet aux bactéries de percevoir leur environnement en détectant la présence de bactéries d'espèces différentes. Ce type de quorum sensing est également la cible de manipulations à la fois par certaines bactéries comme *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* qui peuvent activer une enzyme d'import intracellulaire d'AI-2[167] et par l'hôte capable de fabriquer un mimique d'AI-2[168].

IV.D. Quorum sensing impliquant les AHLs et communication inter-espèces ou « crosstalk »

De nombreuses études ont révélé que le quorum sensing impliquant les AHLs, initialement considéré comme un mode de communication intra-espèce uniquement, paradigme des bactéries Gram négatif, s'avère beaucoup plus complexe que la première description du système LuxI/LuxR[169].

IV.D.1. Quorum quenching

Le quorum quenching (QQ) est la capacité d'interférer avec le QS en bloquant le signal à différentes étapes. Concernant le QS impliquant les AHLs, cela peut intervenir de la manière suivante : inhibition de LuxI et donc de la synthèse des AHLs, inhibition de LuxR et donc de l'activation de la transcription, ou dégradation de la molécule signal. Ce dernier type de QQ a bien été étudié et il existe 3 types d'enzymes capables de dégrader les AHLs : les acylases qui clivent la liaison amine des AHLs, les lactonases qui hydrolysent le noyau lactone et enfin dans une moindre mesure les oxydoreductases

qui oxydent ou réduisent la chaîne carbonée sur le 3^{ème} ou le dernier carbone[170]. L'action des acylases est irréversible alors que celle des lactonases peut être inversée à pH bas. Plusieurs lactonases ont été décrites chez *Bacillus*[171]. Plusieurs familles d'acylases produites par des bactéries qu'elles possèdent ou non un QS impliquant les AHLs ont été identifiées[170]. Par exemple, l'acylase nommée PvdQ de *Pseudomonas aeruginosa* est capable entre autres d'hydrolyser les AHLs à longue chaîne dont la 3-oxo-C12-HSL produite par la même bactérie. L'activité acylase permet donc une adaptation fine de la concentration d'AHL et donc du signal. Grâce au renouvellement des AHLs, la densité bactérienne peut être monitorée en temps réel. Mais si l'on considère une bactérie sans système de QS impliquant les AHLs, la production d'une acylase permet de moduler le signal produit par d'autres bactéries environnantes ou de se protéger contre la potentielle toxicité des AHLs. Effectivement, la 3-oxo-C12-HSL par exemple, en se transformant en acide tétramique a une activité antibactérienne notamment contre les bactéries Gram positif[172].

L'activité QQ a été décrite dans plusieurs situations de communications inter-espèces où elle joue un rôle important : co-culture, biofilms, rhizosphère[170] et écosystème marin[173].

IV.D.2. Spécificité variable des systèmes LuxI/LuxR

Même si le QS impliquant l'AI-2 est considéré comme le mode de communication universel du monde bactérien, plusieurs éléments démontrent que le QS impliquant les AHLs sert également dans le dialogue inter-espèces comme cela a été décrit dans les biofilms mixtes[174].

D'abord certaines bactéries produisent différentes AHLs comme on peut le voir dans le tableau 2. *Pseudomonas aeruginosa* par exemple possède 2 couples d'homologues de LuxI/LuxR, organisés de manière hiérarchique : LasI/LasR impliquant la 3-oxo-C12-HSL qui exerce un contrôle transcriptionnel sur le système RhII/RhIR impliquant la C4-HSL[129]. D'autres bactéries possèdent un couple synthase/récepteur capable de synthétiser et de reconnaître différentes AHLs ; par exemple *Yersinia pseudotuberculosis* peut synthétiser jusqu'à 24 AHLs différentes grâce à la synthase Ytbl et dans une moindre mesure Ypsi[155]. Par ailleurs, la même AHL peut être synthétisée et donc reconnue par plusieurs espèces bactériennes différentes (tableau 2).

Si l'on considère plus précisément les récepteurs de type LuxR, la découverte de la structure de plusieurs d'entre eux a permis de mettre en évidence que la spécificité entre récepteur et AHL était variable selon la conformation et la flexibilité du site de fixation du ligand[175]. Les récepteurs peuvent donc reconnaître un éventail plus ou moins large d'AHLs différentes. Par ailleurs, de nombreux récepteurs de type LuxR orphelins, c'est-à-dire sans synthase type LuxI correspondante,

ont été identifiés[176]. Un exemple est celui du récepteur QscR de *Pseudomonas aeruginosa* qui est sensible et peu spécifique, pouvant reconnaître des AHLs de structures très différentes.

Parmi ces récepteurs LuxR orphelins, SdiA présente un intérêt particulier puisqu'il est produit par des bactéries qui n'ont pas de système de quorum sensing impliquant les AHLs. Il s'agit principalement d'*Escherichia*, *Salmonella*, mais aussi de *Klebsiella*, *Enterobacter*, et *Citrobacter*[177]. Grâce à SdiA, ces bactéries peuvent détecter un large éventail d'AHLs. Même si cela n'a pas été observé directement *in vivo*, SdiA permettrait une stratégie d'interception du signal produit par d'autres espèces bactériennes ou d'espionnage.

IV.E. Quorum sensing impliquant les AHLs et communication « interkingdom »

IV.E.1. Quorum quenching par les paraoxonases eucaryotes

Plusieurs eucaryotes expriment des enzymes ayant une fonction de QQ, mais les mieux étudiées sont les paraoxonases. La famille des paraoxonases (PON) comprend 3 représentants : PON-1, PON-2 et PON-3. Il s'agit d'enzymes très conservées chez les mammifères qui sont capables d'hydrolyser différents substrats dont les AHLs[178]. PON-1 et PON-3 sont exprimées majoritairement dans le foie et le rein et excrétées dans le sérum tandis que PON-2 est exprimée dans divers tissus. PON-2 est parmi les PON celle qui a l'activité lactonase la plus efficace pour hydrolyser les AHLs. Cela pourrait d'ailleurs être un des rôles majeurs de PON-2 puisque son activité concernant les autres substrats est faible comparée à celles de PON-1 et 3[179]. Appuyant cette hypothèse, la reconstruction phylogénétique a suggéré que l'ancêtre des PON est une lactonase bactérienne avec une forte activité de QQ qui aurait été acquise par transfert horizontal[180]. Par son activité de QQ, PON-2 pourrait être fortement impliquée dans la défense vis-à-vis des microorganismes et son expression est d'ailleurs augmentée en situation de stress oxydatif. De plus, dans un modèle de souris PON-2 KO la clairance de *Pseudomonas aeruginosa* est diminuée[181]. La diminution de dégradation de l'AHL 3-oxo-C12 favorise la virulence et diminue le contrôle de l'infection.

IV.E.2. Effets des AHLs sur les cellules eucaryotes

Même si les effets des AHLs sur les cellules eucaryotes végétales dans les rhizosphères ont été étudiés, la majorité des données concerne les effets de l'AHL 3-oxo-C12 produite par *Pseudomonas aeruginosa* sur les cellules eucaryotes humaines[182]. Cette bactérie, pathogène opportuniste, est responsable d'infections chroniques difficiles à traiter par les antibiotiques, chez les patients atteints de mucoviscidose. C'est donc en s'intéressant au mécanisme permettant la chronicité de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* que les effets cellulaires des AHLs ont été décrit. Dès 1995, DiMango *et al*

ont montré que la 3-oxo-C12 à forte concentration avait un effet immunomodulateur en perpétuant la réponse inflammatoire[183]. Depuis, de nombreuses capacités de la 3-oxo-C12 à interagir avec les cellules eucaryotes ont été développées.

IV.E.2.a. Entrée dans les cellules eucaryotes

Grâce à leurs propriétés amphiphiles, les AHLs peuvent diffuser à travers la membrane des cellules eucaryotes comme elles le font pour pénétrer à l'intérieur des cellules bactériennes et se fixer à leur récepteur de type LuxR. Pour le démontrer, plusieurs méthodes expérimentales ont été utilisées. Williams *et al*, ont transfecté des cellules de rein de singe (COS-1) avec un plasmide contenant les gènes de LasR ou RhlR sous le contrôle d'un promoteur eucaryote pour qu'elles expriment des protéines chimériques des récepteurs aux AHLs produites par *Pseudomonas aeruginosa*. Les cellules ont également été transfectées avec un plasmide rapporteur possédant la séquence reconnue par LasR couplée au gène luciférase. Les AHLs 3-oxo-C12 et C4 rajoutées au milieu de culture ont pu induire la bioluminescence, montrant ainsi qu'elles pouvaient pénétrer dans la cellule de mammifère pour atteindre leur cible[184]. En utilisant une 3-oxo-C12 radioactive (³H-3-oxo-C12) pour la localiser dans des cellules T (Jurkat), Ritchie *et al* ont montré que cette AHL entrait très rapidement dans les cellules, avec une concentration maximale atteinte également rapidement et proportionnelle à celle du milieu de culture[185]. Ces données suggérant un transport passif ont été confirmées par Bryan *et al* avec la même technique sur des cellules épithéliales pulmonaires, mais ces derniers ont montré qu'il existait en revanche un mécanisme actif d'efflux pour expulser l'AHL hors de la cellule[186]. Enfin, dans l'étude de Karlsson *et al*, une AHL 3-oxo-C12 fluorescente entrait rapidement dans des cellules épithéliales intestinales Caco-2 et se localisait dans la cellule en partie au niveau du noyau. L'AHL 3-oxo-C12 est donc capable d'entrer passivement dans plusieurs types cellulaires, même s'il n'est pas exclu que certains effets cellulaires soient médiés par l'interaction avec la membrane ou avec un récepteur membranaire[187].

IV.E.2.b. Effet immunomodulateur

Au premier abord, dresser un tableau de l'ensemble des études sur l'effet immunomodulateur des AHLs et particulièrement de la 3-oxo-C12 peut être déconcertant puisque des effets aussi bien pro-inflammatoires qu'anti-inflammatoires de cette molécule du QS y sont décrits. En réalité, ces effets opposés dépendent essentiellement du type cellulaire et de la concentration de la 3-oxo-C12 étudiés[182] mais aussi de l'utilisation ou non d'un stimulus pro-inflammatoire. Sur les cellules épithéliales pulmonaires et les fibroblastes, à une concentration supérieure à 100 µM, la 3-oxo-C12 a un effet pro-inflammatoire[188,189]. Par ailleurs, certains autres effets cellulaires par exemple

l'induction de l'apoptose[190] ou de la phagocytose[191] peuvent avoir des effets pro-inflammatoires indirects. En revanche, sur des cellules majoritairement immunes (lymphocytes, peripheral blood mononuclear cell (PBMC), cellules spléniques, mastocytes, macrophages) stimulées, à une concentration inférieure à 100 μ M, la 3-oxo-C12 a un effet anti-inflammatoire[192–198].

L'exploration des mécanismes et des partenaires cellulaires de l'action immunomodulatrice de la 3-oxo-C12 ont révélé que cette AHL interfère avec la voie NF κ B en inhibant la phosphorylation d'I κ B médiée par le LPS[196] via l'interaction avec le récepteur PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor) [189,199] (figure 13).

Il est également intéressant de noter que la structure de l'AHL est importante pour son effet cellulaire. En effet, l'AHL C4 produite également par *Pseudomonas aeruginosa*, bien qu'elle soit capable d'entrer dans la cellule eucaryote n'a pas de propriété immunomodulatrice. Chhabra *et al* en testant des AHLs de structures différentes ont montré que celles qui avaient un effet immunomodulateur comparable à la 3-oxo-C12 remplissaient les critères suivants : longue chaîne carbonée (8 à 14 C) saturée ou non, substitution hydroxyl ou carboxyl, configuration L du noyau lactone (AHLs bactériennes naturelles), intégrité du noyau lactone[193].

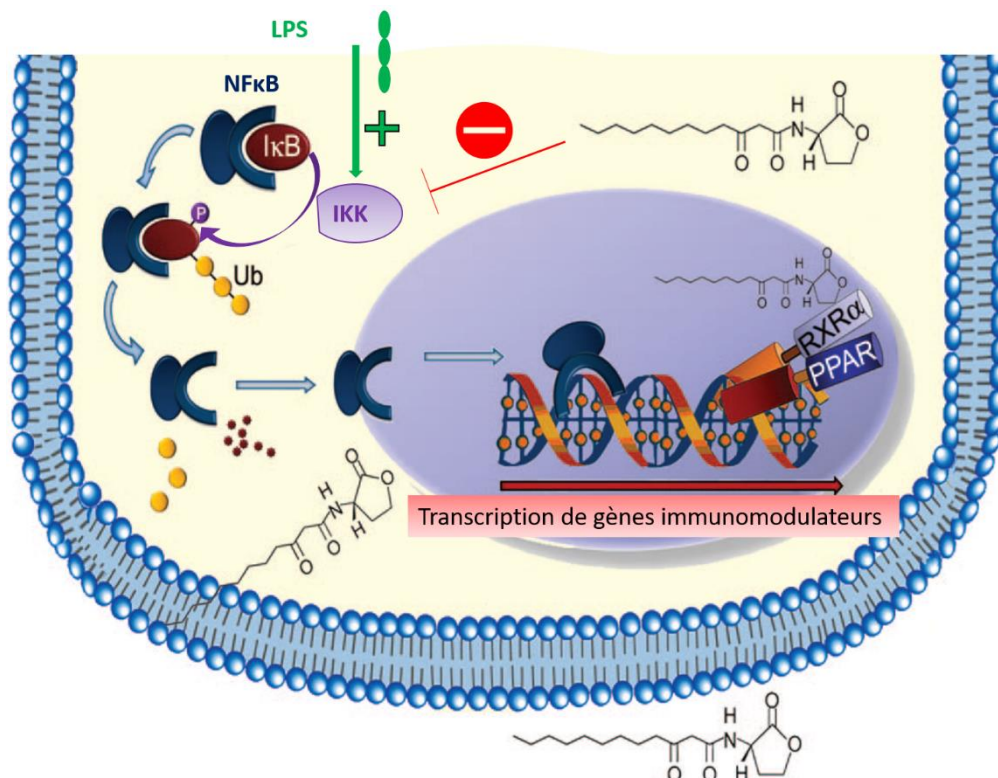


Figure 13. Schéma de l'effet anti-inflammatoire de l'AHL 3-oxo-C12

D'après Teplitski *et al* [182]

IKK (I κ B kinase) phosphoryle I κ B qui est alors ubiquitinée et dégradée. NF κ B est alors libéré et joue son rôle de régulateur transcriptionnel en induisant la transcription de gènes immunomodulateurs. La 3-oxo-C12 inhibe IKK et donc la voie NF κ B, probablement en interagissant avec le récepteur PPAR.

IV.E.2.c. Effet sur la perméabilité

Mais les capacités de la 3-oxo-C12 à modifier les voies de signalisation des cellules eucaryotes ne se limitent pas aux effets immunomodulateurs. Les différents travaux de Vikström *et al* ont mis en évidence sur des cellules Caco-2 que la 3-oxo-C12 est capable d'altérer la barrière épithéliale. En effet sur des cellules polarisées, la 3-oxo-C12 à concentration relativement élevée (100-300 μ M) diminuait la résistance électrique transépithéliale et augmentait le flux paracellulaire de dextrans de différentes tailles[200]. Cette augmentation réversible de la perméabilité paracellulaire est le résultat de la modulation des jonctions serrées et des jonctions adhérentes. Les mécanismes impliqués sont les suivants : diminution de l'expression de certaines protéines de jonction, altération de la structure des complexes jonctionnels par la modification de l'état de phosphorylation de certaines protéines et enfin l'augmentation du calcium intracellulaire[200–203] (figure 14). La même équipe a également montré que la 3-oxo-C12 diminuait la motilité des cellules épithéliales intestinales en inhibant le remodelage des filaments d'actine. L'AHL semble interagir avec IQGAP1 (IQ-motif containing GTPase-activating protein), une protéine impliquée dans l'organisation de l'actine et des microtubules dans des processus de motilité cellulaire [204] (figure 14). Cet effet supplémentaire gêne à la réparation de l'épithélium et contribue donc à l'altération de la barrière épithéliale intestinale.

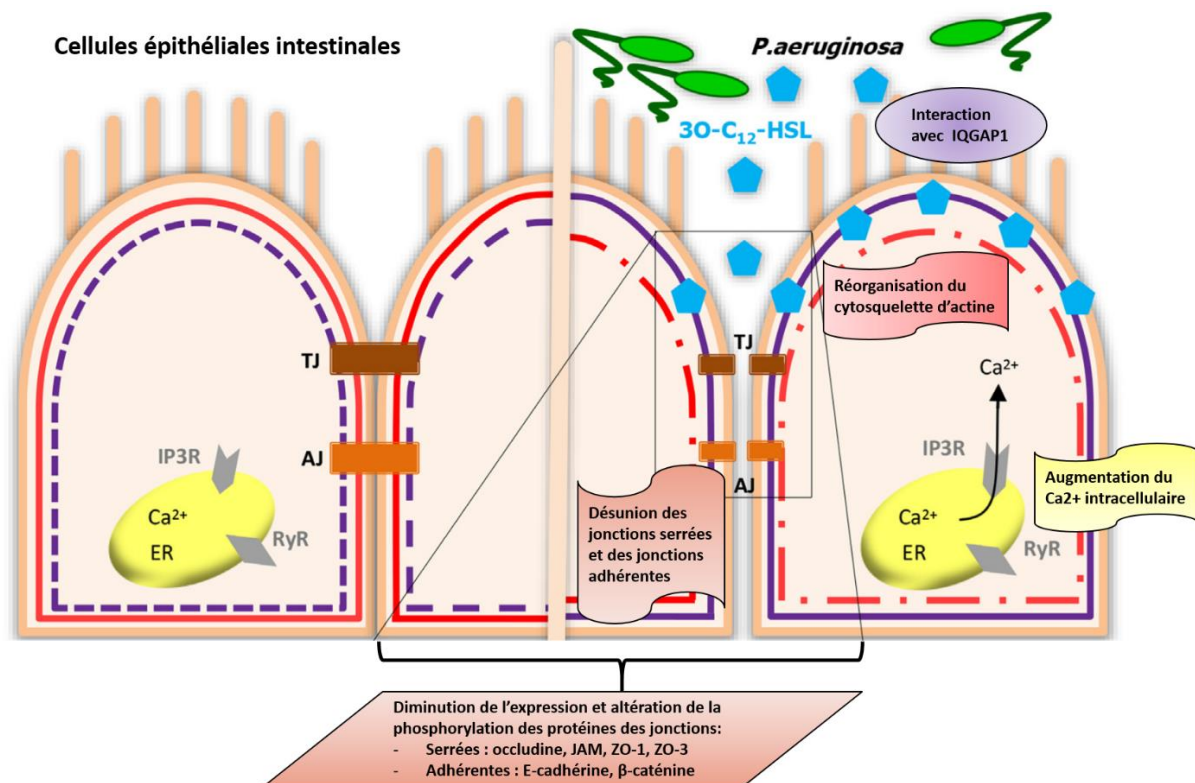


Figure 14. Schéma de l'effet de l'AHL 3-oxo-C12 sur la perméabilité intestinale

D'après Holm et Vikström[205]

IV.E.2.d. Autres effets cellulaires

D'autres effets cellulaires des AHLs ont été largement étudiés. C'est le cas notamment de l'induction de l'apoptose, un effet toujours relativement spécifique de la 3-oxo-C12, à des concentrations élevées et sur plusieurs types cellulaires différents : macrophages et polynucléaires neutrophiles[206], fibroblastes et cellules endothéliales[190], lymphocytes et monocytes[207]... Les études sur la voie de l'apoptose activée sont contradictoires: certaines suggèrent qu'il s'agit de la voie extrinsèque *via* les caspases[206], d'autres qu'il s'agit de la voie intrinsèque ou mitochondriale de l'apoptose qui est activée[207,208]. Les 2 mécanismes sont probablement impliqués[209].

En outre, même si certains de ces mécanismes ont déjà été évoqués précédemment, l'AHL 3-oxo-C12 est capable de modifier la distribution intracellulaire du calcium[190,202], d'altérer le réticulum endoplasmique[208], d'induire la migration des neutrophiles par chimiotactisme[204,210], et de modifier l'expression des TLR (toll like receptors) sur différentes cellules immunes[211,212].

Enfin, la 3-oxo-C12 est capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'expression de PON 2[213], contrecarrant ainsi l'action des cellules eucaryotes pour l'inactiver.

V. QUORUM SENSING ET ECOSYSTEME INTESTINAL

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe avec un nombre et une diversité importante de micro-organismes et notamment de bactéries qui cohabitent. Par ailleurs, ouvert au milieu extérieur l'écosystème intestinal est aussi le lieu de passage de bactéries pathogènes. Dans ce contexte, l'implication du QS y paraît cohérente.

Tout d'abord AI-2, parce qu'il est considéré comme un langage bactérien universel et parce qu'il est présent chez plusieurs pathogènes intestinaux, a été considéré comme un excellent candidat pour la communication interbactérienne au sein de l'écosystème intestinal. En effet AI-2 a été très étudié chez *Vibrio cholerae*, les *Escherichia coli* pathogènes, *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella flexneri* et *Campylobacter jejuni*[214]. Il a également été décrit chez des bactéries intestinales commensales : *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lachnospira*, *Ruminococcus*, *Roseburia*...[215–217]. L'élément le plus frappant provient d'une étude récente dans laquelle Thompson *et al* ont montré sur un modèle murin présentant une dysbiose post-antibiothérapie, que des niveaux élevés d'AI-2 dans l'intestin permettaient d'augmenter le ratio Firmicutes/Bacteroidetes, favorisant ainsi la restauration d'une normobiose[218].

Mais, comme décrit précédemment, le QS impliquant les AHLs est aussi mis en jeu dans la communication inter-espèces bactériennes et dans la relation hôte-bactérie également et pourrait

par conséquent jouer un rôle important au sein du microbiote intestinal. Il a été décrit dans des écosystèmes marins et différentes rhizosphères[113,219,220] mais les données sur les AHLs dans l'écosystème complexe que représente le microbiote intestinal humain sont peu nombreuses. La majorité de ces données provient de l'étude de pathogènes intestinaux. En effet les bactéries pathogènes *Yersinia enterocolitica* et *pseudotuberculosis* produisent plusieurs AHLs avec 2 systèmes de type LuxI/LuxR chacune organisés de façon hiérarchique[146,148,214]. Par ailleurs, *Pseudomonas aeruginosa* dont le quorum sensing a été largement étudié peut être présente dans l'écosystème intestinal. Enfin la mise en évidence chez de nombreuses entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*, mais aussi de *Klebsiella*, *Enterobacter*, et *Citrobacter*) du récepteur orphelin SdiA capable d'écouter le signal émis par d'autres bactéries en reconnaissant les AHLs qu'elle produit [177] suggère que les bactéries de l'écosystème intestinal pourrait utiliser les AHLs pour communiquer. Mais le quorum sensing impliquant les AHLs n'a pas été mis en évidence chez des bactéries commensales intestinales et les études *in vivo* sont peu nombreuses. Utilisant des systèmes rapporteurs bactériens avec leurs limites, des AHLs ont été retrouvées dans le rumen de vaches[221] et dans les selles de nouveau-nés [222]. Devant ce manque de données, Swearingen *et al* ont publié une revue en 2013 où ils posaient la question : y-a-t-il des AHLs dans les intestins des mammifères ?[223] L'hypothèse qu'ils émettent est que les AHLs sont produites par la communauté microbienne complexe du tractus intestinal humain bien qu'elles n'aient jamais été détectées jusqu'à maintenant.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. DECOUVERTE DE LA N-ACYL HOMOSERINE LACTONE 3-OXO-C12 :2, MOLECULE DU QUORUM SENSING MAJEURE DU MICROBIOTE INTESTINAL ET SON EFFET SUR LES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES

I.A. Introduction à l'article

Le QS impliquant les AHLs a été décrit dans de nombreux écosystèmes mais n'avait jamais été mis en évidence jusqu'à présent dans l'écosystème intestinal humain. Par ailleurs, des éléments indirects provenant d'études concernant les PON suggèrent qu'il pourrait être impliqué dans la dysbiose au cours des MICI. Ces travaux ont montré que l'activité de la PON-1 était significativement diminuée chez les patients présentant une MICI active par rapport à des sujets sains[224] et que le polymorphisme de PON-1 (allèle 192R) conduisant à une plus forte activité paraoxonase est associé à une diminution du risque de survenue de MICI[225].

Les données récentes mettent en exergue le rôle de l'interaction hôte-microbiote dans la phytopathologie complexe des MICI[6,226]. Pour aller plus loin dans la compréhension de la dysbiose associée aux MICI, il est indispensable d'étudier ses conséquences fonctionnelles et son impact sur les voies de l'inflammation. Pour cela, la recherche de métabolites du microbiote intestinal impliqués dans le dialogue avec l'hôte est particulièrement d'actualité[9,10,24].

C'est aussi dans cette optique et en considérant que les données sur les PON indiquent que les AHLs participent très probablement au dialogue hôte-microbiote dans le cadre des MICI, que nous avons étudié le QS impliquant les AHLs.

Ce premier article soumis rapporte la découverte d'AHLs et plus particulièrement d'une nouvelle AHL, la 3-oxo-C12 :2 dans l'écosystème intestinal humain grâce à une méthode d'extraction originale et à l'utilisation de la spectrométrie de masse. Cette méthode d'extraction telle qu'elle est décrite dans l'article est le fruit d'un long travail de mise au point pour réussir à déterminer un protocole, robuste, faisable, reproductible et adapté à la détection de la plus grande diversité d'AHLs possible dans un milieu extrêmement complexe.

Par ailleurs, le caractère translationnel de cette étude a permis en couplant le profil d'AHL par spectrométrie de masse à l'analyse classique du microbiote fécal par qPCR et par séquençage des gènes de l'ARN 16S, de mettre en évidence que cette nouvelle AHL 3-oxo-C12 :2 était diminuée au cours des MICI et corrélée à un état de normobiose.

Après les difficultés concernant la mise au point du protocole d'extraction, nos efforts ont été concentrés à identifier par spectrométrie haute résolution puis à synthétiser l'AHL d'intérêt. Cette

étape cruciale nous a permis d'aller plus loin en étudiant l'effet de la 3-oxo-C12 :2 *in vitro* sur les cellules épithéliales intestinales Caco-2. Nous avons comparé ses effets à ceux de la 3-oxo-C12 de structure proche. Les effets cellulaires de cette AHL, produite par *Pseudomonas aeruginosa*, ont été largement décrits dans la littérature, posant ainsi les jalons de la place des AHLs dans la communication hôte-bactéries. Les résultats obtenus sont particulièrement intéressants puisqu'ils montrent que la 3-oxo-C12 :2 a des propriétés anti-inflammatoires comparables à celles de la 3-oxo-C12 sans augmentation de la perméabilité intestinale.

Cette molécule est donc à la fois associée à un microbiote normobiotique et possède un effet que nous avons qualifiée de « protecteur » sur les cellules épithéliales intestinales. Cela suggère que la l'AHL 3-oxo-C12 :2 pourrait jouer un rôle important dans l'interaction microbiote-épithélium intestinal et par conséquent dans la physiopathologie des MICI.

Cet article preuve de concept ouvre la voie de l'étude du quorum sensing impliquant les AHLs dans l'écosystème intestinal humain en général et de la 3-oxo-C12 :2 au cours des MICI en particulier.

II.B. Article soumis

Title: Discovery of *N*-Acyl Homoserine Lactone 3-oxo-C12:2, a major quorum sensing molecule from gut microbiota and its effect on gut epithelial cells

Cécilia Landman^{1,2}, Jean-Pierre Grill², Jean-Maurice Mallet³, Lydie Humbert², Eric Le Balc'h², Marie-Anne Maubert², Wahiba Chaaara⁴, Loic Brot², Laurent Beaugerie^{1,2}, Harry Sokol^{1,2}, Sophie Thenet^{5,6}, Dominique Rainteau², Philippe Seksik^{1,2*}, Elodie Quévrain^{2*}

Affiliations

1 Department of Gastroenterology, Sorbonne Universités, AP-HP, Hospital Saint-Antoine, Paris, France.

2 Sorbonne University-UPMC Univ Paris 06, INSERM ERL 1157, Laboratoire des Biomolécules, École normale supérieure, DHU I2B, Paris, France.

3 Department of Chemistry, École Normale Supérieure-PSL Research University, Paris, France.

4 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMRS 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (i3), Paris, France.

5 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

6 PSL Research University, EPHE, Paris, France.

Corresponding author : Pr Philippe Seksik, MD, PhD

Email : philippe.seksik@aphp.fr

27 rue de Chaligny 75012 Paris

Tél : +33 (0)1.40.01.13.23

Service de Gastroentérologie & Nutrition

Hôpital Saint-Antoine 184, rue du Faubourg St-Antoine 75012 Paris

Tél : + 33 (0)1.49.28.31.62

Word count: 3976

Key words: inflammatory bowel diseases, gut microbiome, quorum sensing, *N*-Acyl Homoserine lactones, epithelial cells, gut inflammation

Abstract

Objective: Auto-inducer quorum sensing molecules N-acyl-homoserine lactones (AHLs) involved in bacterial communication network are also able to interact with eukaryotic cells. Searching for these molecules in the context of inflammatory bowel diseases (IBD) is appealing. The aims of our study were to look for AHLs molecules in fecal samples from healthy subjects (HS) and IBD patients, to correlate AHLs profiles to microbiome and to investigate the effect of AHL of interest on epithelial cells. **Design:** using mass spectrometry, we characterized AHLs profiles in fecal samples from HS (n=26) and IBD patients in remission (n= 24), and in flare (n=25) and correlated presence of AHL of interest with gut microbiota composition obtained by real-time qPCR and 16S sequencing. We synthesized AHL of interest in order to test inflammatory response after IL1 β stimulation and paracellular permeability on Caco-2 cells. **Results:** We observed 14 different AHLs among which one was prominent. This AHL corresponded to 3-oxo-C12:2 and was significantly less found in IBD patients in flare (16%) and IBD patients in remission (37.5%) versus HS (65.4%) (p=0.001). Presence of 3-oxo-C12:2 was associated with significantly higher counts of Firmicutes especially *F. prausnitzii* and lower counts of *E. coli*. In vitro, 3-oxo-C12:2 exerted anti-inflammatory effect on Caco-2 cells. Interestingly, although 3-oxo-C12, the well-known AHL from *Pseudomonas aeruginosa*, increased paracellular permeability, 3-oxo-C12:2 did not. **Conclusion:** We identified AHLs in human gut microbiota and discovered a new and prominent AHL 3-oxo-C12:2 that correlates with normobiosis and exerts protective effect on gut epithelial cells.

Summary box:

1. What is already known about this subject?
 - Quorum sensing involving N-acyl homoserine lactones (AHLs) is a interbacterial communication network
 - AHLs also proved to be involved in an inter-kingdom communication i.e. host-bacteria interactions.
 - Quorum sensing has been described in many bacterial ecosystems and in some intestinal pathogens but has never been studied in the human intestinal microbiota.
2. What are the new findings?
 - We identified for the first time AHLs in human gut microbiota.
 - We discovered a new AHL, namely AHL 3-oxo-C12:2 which was prominent in human gut ecosystem.
 - This AHL correlates with healthy state normobiosis and is lost in inflammatory bowel disease (IBD) associated dysbiosis.
 - AHL 3-oxo-C12:2 exerts protective effect on gut epithelial cells.
3. How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?
 - Our results pave the way for potential effects of the loss of 3-oxo-C12:2 in IBD.
 - In the field of ecological therapeutic approach in IBD, our results should be considered as a cornerstone for a new concept to control gut inflammation and to manipulate gut microbiota.

INTRODUCTION

Inflammatory bowel diseases (IBD) represented by two main diseases, namely Crohn's disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) are characterized by a chronic inflammatory of gut mucosa leading to bowel damages and increased intestinal cancer risk[1,2]. The socio-economic issues are important because they affect young subjects and the incidence is relatively high in industrialized countries (8-15 per 100 000 inhabitants/year)[3,4]. The exact physiopathogeny of IBD remains unknown but involves a dysregulated immune response to the gut microbiota in genetically predisposed host[5–8].

The intestinal microbiota is composed of trillions of bacteria (10^{13} bacteria)[9] belonging to 2 major phyla (Firmicutes and Bacteroidetes)[10]. It has been shown to play major roles in human physiology and it is notably involved in intestinal barrier and immune system maturation[11]. Several convergent studies have shown that IBD patients exhibit dysbiosis (i.e. a disruption of the gut ecosystem equilibrium) characterized by restricted biodiversity, temporal instability and a quantitative decrease of bacteria belonging to the Firmicutes phylum, especially *Faecalibacterium prausnitzii* [12–15].

Recent data highlighted the role of the host-microbiota interactions within IBD puzzling physiopathology[8,16]. To go further, it is worthwhile to explore the functional consequences of IBD associated dysbiosis on gut inflammation by looking for molecules from gut microbiota implicated in the dialog with host[17–19]. In this setting, we decided to focus on quorum sensing (QS) molecules. Indeed, bacterial cell-cell communication, also known as quorum sensing (QS), relies in the ability of a bacteria to monitor and respond to microbial density, via diffusible signal molecules called auto-inducers. This process allows bacterial populations to coordinate gene expression and behavior such as bioluminescence, secretion of virulence factors or biofilm formation. First described and most studied type of QS is mediated by small amphiphilic molecules with a homoserine lactone ring moiety and an acyl side chain with variable length and substitution, called N-acyl-homoserine lactones (AHLs). Mostly found in Gram-negative bacteria, they are biosynthesized by a LuxI-type synthase[20,21]. Then, AHLs diffuse freely in and out of the cell and in the extracellular medium. Once the bacterial density reaches the quorum, a threshold concentration of AHLs is also reached and they are recognized by their cognate intracellular LuxR-type receptors, triggering a signal transduction cascade that results in population-wide changes in gene expression[22,23].

First considered as a bacterial communication network only, QS driven by AHLs also proved to be involved in an inter-kingdom communication i.e. host-bacteria interactions[24]. Importantly, paraoxonases (PON) are enzymes expressed in eukaryotic cells, able to exert a “quorum quenching” activity while hydrolyzing AHLs lactone ring moiety[25]. Conversely, it has been shown that pathogens can use AHLs as a virulence factor *per se* to modulate host immune responses, as it has been well described with 3-oxo-C12-AHL from *Pseudomonas aeruginosa*[26].

QS has been described in many bacterial ecosystems, but had never been studied in the human intestinal microbiota[27] and could be involved in IBD related dysbiosis since recent studies concerning PON-1 suggest that AHLs mediated QS could play a role in IBD. They have shown that PON-1 activity is significantly decreased in patients with active IBD versus healthy subjects [28]. Moreover, PON-1 192R allele carriage, which leads to a more active enzyme, is associated with reduced risk of IBD[29].

Eventually, small molecules from QS appear to be a new trail in IBD physiopathology as they could be involved in the regulation of the shape of the gut microbiota but also in host-microbiota interactions.

Thanks to the development of an original extraction and detection method, the aim of our study was to describe fecal AHL profile in IBD patients compared to healthy subjects in parallel with gut microbiota composition. Furthermore, we investigated the effect on epithelial cells of a novel AHL identified from human gut microbiota.

METHODS

Patients and samples

We collected fecal samples from IBD patients and from healthy volunteers who provided informed consent. None of the patients had a history of bowel resection. None of the patients or healthy volunteers had taken antibiotics within 3 months before the sampling. Fecal samples were frozen within one hour and stored at -80°C until analysis.

Demographic data, disease characteristics, disease activity and biological features at the time of sampling were extracted from MICISTA registry and patient files.

AHL detection and characterization

Sample pretreatment and optimized protocole for AHL extraction

Each fecal sample was lyophilized for 72 hours. AHL were extracted from one gram of lyophilized feces with an original optimized method associating solid-liquid extraction using a Soxhlet apparatus and solid phase extraction using a reverse phase C18 cartridge (Sep-Pak Waters 12cc 2g) (see online supplementary materials and methods for details).

AHL detection by High pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

The chromatographic separation of AHL was carried out on a Zorbax eclipse XDB-C18 (Agilent Technology, Garches, 92380, France) fitted on an Agilent 1100 HPLC system (91745 Massy, France) (see online supplementary materials and methods). AHLs were separated according to their hydrophobicity depending on the length of the acyl side chain, the nature of the substitution on the third carbon and the presence of unsaturations [30].

Mass spectra were obtained using an API® 2000 Q-Trap (AB-Sciex, Concord, Ontario, Canada) equipped with a Turbolon electrospray (ESI). Data were acquired by the Analyst® software (version 1.4.2, AB-Sciex) in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode (see online supplementary materials and methods). Identification of an AHL (designated by m/z of the precursor ion) was defined by the presence at the same retention time of the precursor ion and the two possible product ions ($[M+H -101]^+$ and 102)[31] (figure S1).

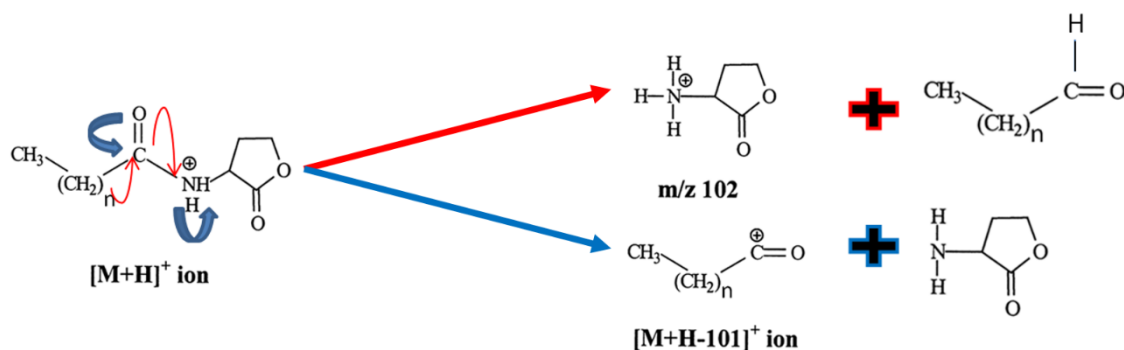


Figure S1: MS-MS fragmentation of an AHL with the two product ions ($[M+H-101]^+$ and 102) obtained from the precursor ion $[M+H]^+$

The AHL quantification was expressed in nmol per gram of feces after calibration of the method, with weighed mixtures of commercially available AHL (C4-HSL, C7-HSL, 3-OH-C10-HSL, 3-OH-C12-HSL, 3-oxo-C12-HSL, C14-HSL and 3-oxo-C14 :1-HSL) and normalization relative to the internal standard (C6-d3-HSL).

AHL characterization

High resolution mass spectrometry

Fractions containing AHL of interest were sampled using a pool of HPLC fractions according to observed retention time and analyzed by High resolution mass spectrometry using LTQ-Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific) with infusion flow of $3\mu\text{L}/\text{min}$. Full scan analysis allowed to obtain the precise mass of the relevant molecule. Then, predicted formula was deduced.

AHL biosensor

The bacterial biosensor strain *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, kindly provided by Dr P. Williams' lab (University of Nottingham) was used to assess the quorum sensing activity of the identified AHLs[32] (see online supplementary materials and methods).

Microbiota analysis

DNA was extracted as described previously[12] from 200mg of faeces using the GNOME DNA Kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) according to the manufacturers' instructions. A step of disruption was achieved by the addition of a volume ($750\mu\text{l}$) of 0.1 mm diameter silica beads and agitation in a Bead-Beater for 10 minutes. Real time qPCR (quantitative polymerase chain reaction) was performed as described previously[33], using an ABI 7000 Sequence Detection System apparatus with 7000 system software v. 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) (see online supplementary materials and methods). We used real-time qPCR to quantify in gut microbiota the total bacteria, the dominant bacterial groups (*Bacteroides/Prevotella*, *Cocoides*, *leptum*, *Bifidobacterium*), the subdominant group *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* and specific species *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli*. Group and species-specific 16S rRNA-targeted primers used in this study were purchased from Eurogentec, their sequences are shown in (table S1).

Due to the quality of DNA extraction, among all samples ($n=75$), 67 (from 25 HS, 21 IBD in remission and 21 IBD in flare) were analyzed through 16S gene sequencing as described previously[34].

Synthesis of AHL 3-oxo-C12 :2

The AHL 3-oxo-C12:2 was synthesized from commercially available 4-pentyn-1-ol (Fluorochem UK, Derbyshire). The alcohol was first protected with chloromethyl methyl ether. The acyl chain was elongated and the desired double bonds installed by organometal coupling with 1-bromo-2-pentyne, and alkynes reduction to alkenes. The alcohol was then deprotected and oxidized into carboxylic acid, which was further coupled to Meldrum's acid to afford the active derivative. This derivative was finally reacted with homoserine lactone to afford the desired molecule (figure S2).

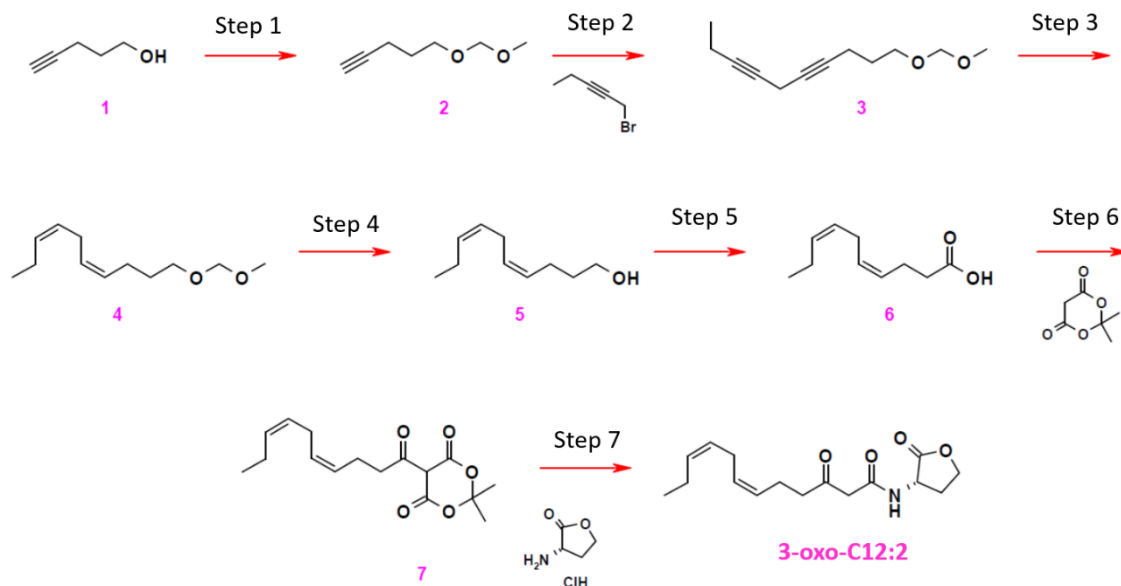


Figure S2: Steps of 3-oxo-C12:2 synthesis from 4-pentyn-1-ol

Caco-2 cells experiments

Caco-2/TC7 cell cultures

The human colon cancer cell line Caco-2/TC7 was cultured in 6-well culture plates in high-glucose Dulbecco's modified Eagle medium Glutamax I (GIBCO), supplemented with 20% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (GE Healthcare/ PAA), 1% non-essential amino acids (GIBCO) and 1% penicillin/streptomycin (PAA company), at 37°C in a 10% carbon dioxide/air atmosphere. The culture media were changed every day.

Inflammatory response

After 14 days, culture media was changed for a « starvation » media without FCS for 24 hours. Before stimulation, selective PON inhibitor 2-hydroxyquinoline (2HQ) at the concentration of 100µM (to disrupt Caco-2 PON activity) was added, and the following conditions were tested: with 0,1% DMSO alone or increasing concentrations of 3-oxo-C12 (Sigma-Aldrich®) and 3-oxo-C12:2 in 0,1% DMSO. Caco-2/TC7 cells were then stimulated by Interleukin 1 beta (IL-1B) (Sigma-Aldrich®) at 25 ng/mL. After 18 hours, cell supernatants were removed for Interleukin 8 (IL-8) assay and cells were washed and scraped into 200µL Triton 1X for the protein assay. IL-8 concentrations were determined using an ELISA assay (DuoSET Human CxCL8/IL-8, R and D Systems®) and delivered to the total cell-protein content. All experiments were done in duplicate.

Permeability assay

Caco-2/TC7 cells were cultured in the same conditions as described above in 6-well Costar Transwell (3 µm pore size; Sigma-Aldrich®). From confluency, they were switched to asymmetric conditions, i.e. with medium containing 20% FCS in the basal compartment and serum-free medium in the apical compartment. At day 18, the apical medium was supplemented with 100µM of PON inhibitor 2HQ and with DMSO 0,1%, 3-oxo-C12 or 3-oxo-C12:2 (200µM) during 4 or 20 hours. To assess paracellular permeability, Fluorescein isothiocyanate-labeled Dextran 4 kDa (FD4) tracer (TdB consultancy, Uppsala, Sweden®) was added to the apical surface of the cell monolayers to a final concentration of 250µM. Four hours later, samples of basal medium were collected and fluorescence was determined with a FLUOSTAR Omega (BMG Labtech®) calibrated for excitation at 485 nm and emission at 520 nm.

Statistical analysis

Statistical analyses for significant differences were performed with the Student t test for unpaired data, and by Wilcoxon's non-parametric test when appropriate. Qualitative data were compared within groups using the χ^2 test (Jump software, JMP SAS). For searching association between AHL of interest and gut microbiota, differential analysis of bacteria quantity between stool samples were performed using relative quantification (2⁻DDCT) data. For each sample, individual bacteria quantification values were normalized into relative proportion so the sum per sample across all bacteria is 100. Correlation test was applied using Pearson coefficient.

For microbiota sequencing analysis GraphPad Prism V.6.0 (San Diego, California, USA) was used for all analyses and graph preparation. Results are expressed as mean±SEM, and statistical analyses were performed using the two-tailed non-parametric Mann–Whitney U test or Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test. The number of observed species as well as the Shannon and Chao1 diversity indexes were calculated using rarefied data (depth=2000 sequences/sample) and used to characterize species diversity in a community. Statistical significance of sample grouping for beta diversity analysis was performed using Permanova method (9999 permutations). Differences with a p value <0.05 were considered significant. Principal component analyses of the Bray Curtis distance with each sample were built and used to assess the variation between experimental groups (beta diversity). Differential analysis was performed using the linear discriminant analysis effect size (LEfSe) pipeline[35]. MaAsLin, a multivariate statistical framework, was used to find associations between clinical metadata, AHL 3-oxoC12:2, and microbial community abundance. Correlation within microbial taxa abundance data was measured by Spearman correlation test.

RESULTS

Detection of AHLs in human gut microbiota from IBD patients and healthy controls

Patients

We collected 75 fecal samples from 49 IBD patients (22 CD and 27 UC) during flares (n=24) and remission (n=25) and from 26 healthy subjects (HS). The demographic, clinical, biological and therapeutic data of IBD patients and HS are represented in table 1.

	HS n=26	IBD in remission n=24	Active IBD n= 25
Sex (male)	11 (42.3%)	15 (62.5%)	11 (44%)
Age (years old) (mean+/-SEM)	35.4 +/-2.8	41.5 +/-2.5	35.6 +/- 2.5
Smokers	2* (7.7%)	8 (32%)	6 (24%)
Type of IBD	—	12 UC (50%)/12 CD	15 UC (60%)/10 CD
Disease duration (years) (mean+/-SEM)	—	11.0+/-2.2	4.3+/-1.0*
Disease location Montreal classification	—	CD : L1 (n=3), L2 (n=2), L3 (n=7) p (n=5) UC : E1 (n=1), E2 (n=6) E3 (n=5)	CD : L1 (n=2), L2 (n=6), L3 (n=2) p (n=6) UC : E1 (n=1), E2 (n=7), E3 (n=7)
Disease activity scores (mean+/-SEM)	—	HBI: 1.7 +/-0.3 Mayo : 0.8+/-0.2	HBI : 9.2 +/-1.9** Mayo :6.7+/-0.3***
CRP (mg/L) (mean+/-SEM)	—	4.5+/-1.2	49.1 +/-8.7***
Hemoglobin (g/dl) (mean+/-SEM)	—	13.7+/-0.4	11.8+/-0.4*
Treatment	—	CS (2), 5ASA(14), IS (9), Biologic (18)	CS (5), 5ASA(12), IS (5), Biologic** (7)

Table 1- Patients and controls characteristics

* $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ *** $p < 0.001$: p values from difference vs the IBD group in remission

HS: healthy subject, IBD : inflammatory bowel diseases, SEM : standard error of the mean, UC : ulcerative colitis, CD : Crohn's disease, HBI : Harvey Bradshaw index, CRP : C-reactive protein, CS : corticosteroids, 5ASA : 5-aminosalicylates, IS : immunosuppressive agent.

Identification of N-acyl-homoserine lactones in human gut microbiota

We identify 14 different AHLs from human fecal samples using HPLC-MS/MS. Each AHL is designated by its m/z value. AHLs distribution among samples is represented on a heat map (figure 1). Among these identified AHL, one at m/z 294.2 is prominent (30/75, 40% of the samples). All other AHLs were found in less than 10 fecal samples.

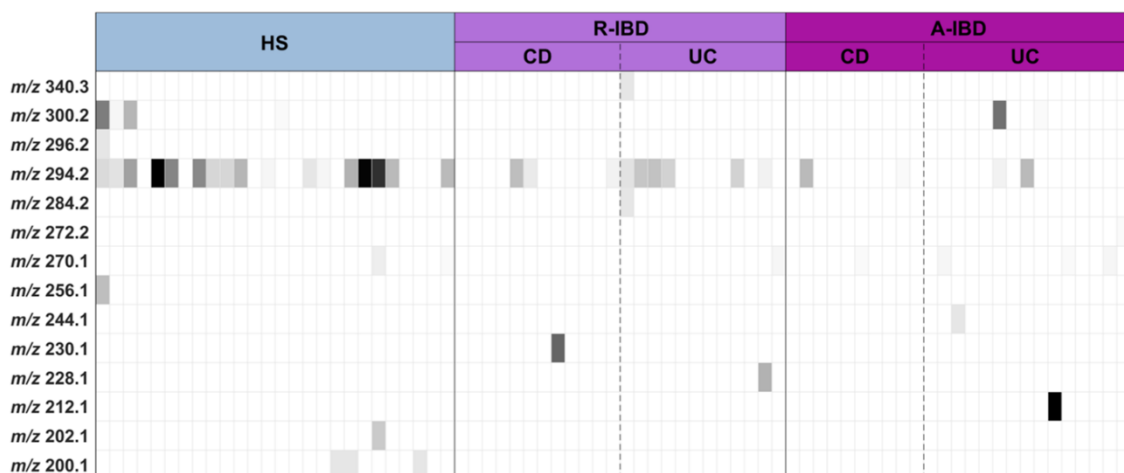


Figure 1. Heatmap of the results of AHL profile in IBD patients and healthy controls. AHL are designated by their m/z . Grey color bar indicates AHL m/z concentrations from no (white) to highest concentration (black)

HS : healthy subject, R-IBD : inflammatory bowel disease patients in remission, A-IBD : inflammatory bowel disease patients in flare, UC : ulcerative colitis, CD : Crohn's disease

Identification of the major AHL from gut microbiota: 3-oxo-C12:2

Using HPLC, we harvested fractions containing AHL at m/z 294.2 to obtain its precise mass. Using high resolution mass spectrometry (LTQ-Orbitrap XL) (figure 2), we determined the accurate m/z of this protonated AHL ($[M+H]^+$): 294.1700. We deduced its formula: $C_{16}H_{24}O_4N$, that corresponds to unsaturated *N*-3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone with two double bonds (3-oxo-C12:2).

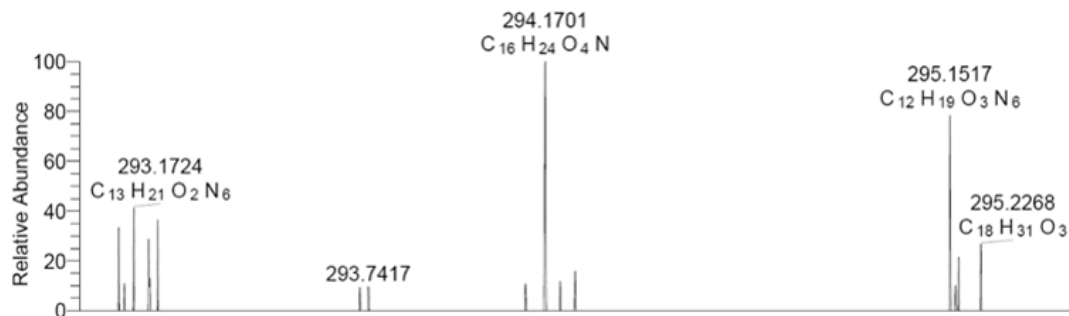


Figure 2. Full scan (80-100) of the fraction containing AHL at m/z 294.2 using high resolution mass spectrometry (LTQ-Orbitrap XL) in infusion mode with its precise mass and deduced formula.

We then tested the pooled fractions containing 3-oxo-C12:2 on NTL4 biosensor. Concentrated fraction (X5) tested positive (figure S3) confirming quorum sensing activity of an AHL.

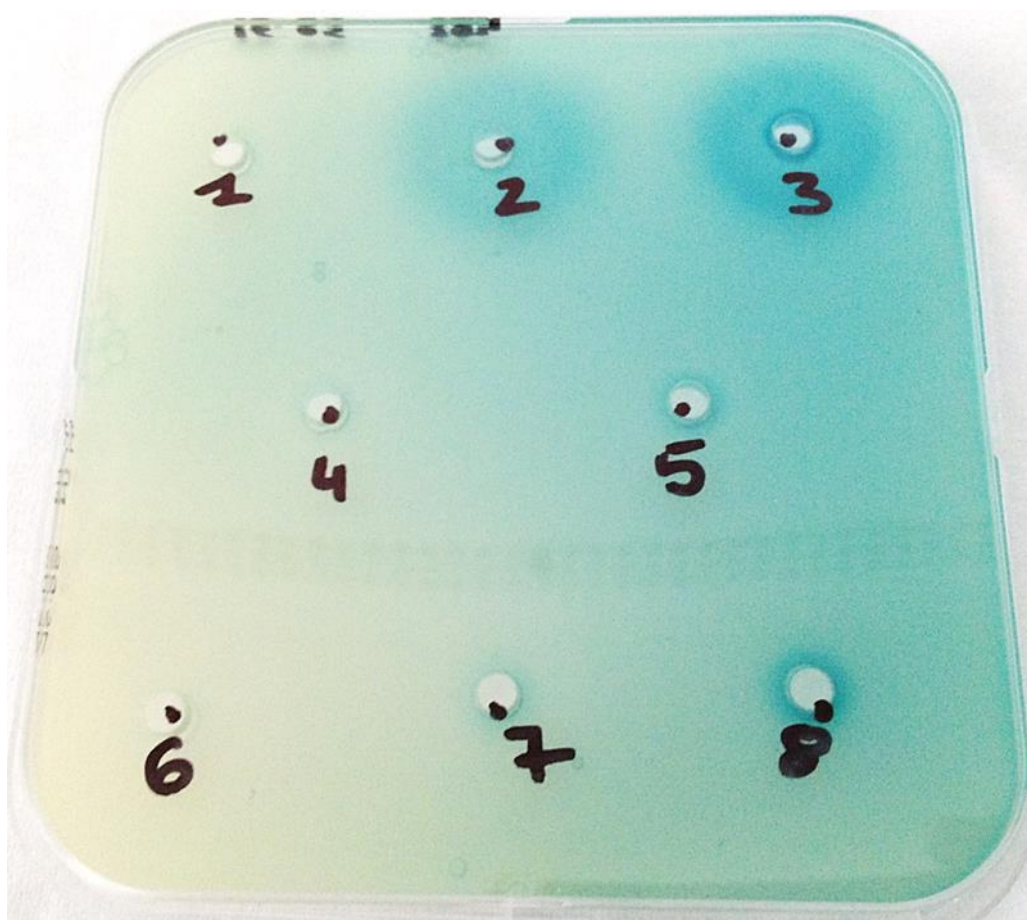


Figure S3: Results of NTL4 biosensor with AHL at m/z 294.2

1: control (water) 2: C7 5 μ M 3: 3-oxo-C12 5 μ M, HPLC fraction with AHL at m/z 294.2 with different concentrations : 4 : X1/10 , 5 : X1/2 , 6 : X1, 7 : X2.5 , 8 : X5.

Distribution of 3-oxo-C12 :2 in IBD patients

AHL 3-oxo-C12 :2 was significantly less found in IBD patients in flare (4/25, 16%) and IBD patients in remission (9/24, 37.5%) versus healthy subjects (17/26, 65.4%) ($p=0.001$) (figure 3A). Furthermore 3-oxo-C12:2 fecal concentrations were significantly higher in healthy subjects (2.62 +/- 0.80 nmol/g of feces) compared to IBD patients in remission (0.58 +/- 0.18 nmol/g of feces, $p=0.014$) and in flare (0.25 +/- 0.15 nmol/g of feces, $p=0.0002$) (figure 3B).

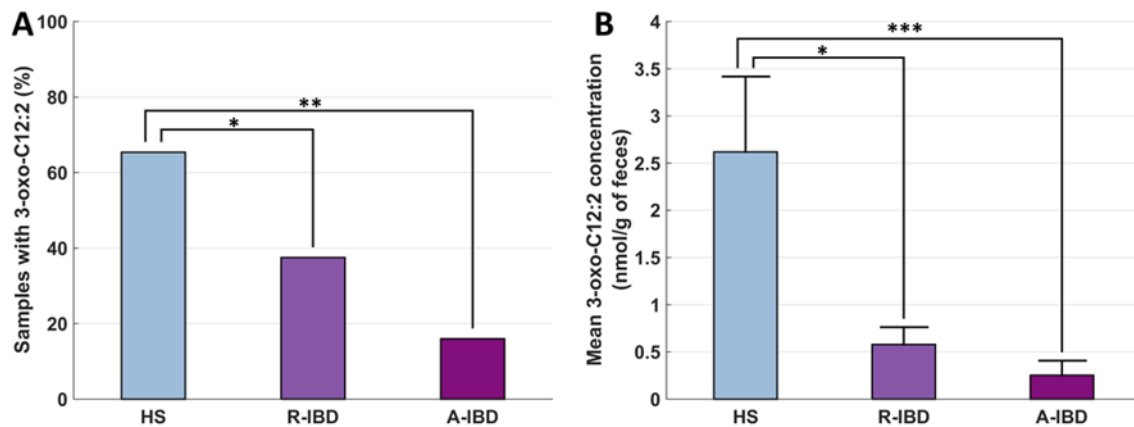


Figure 3. Bar graph of AHL 3-oxo-C12:2 distribution and concentration among healthy subjects (HS) and IBD in remission (R-IBD) and in flare (A-IBD). A : proportion of samples with AHL 3-oxo-C12:2. B: mean 3-oxo-C12:2 fecal concentration. * $p<0.05$ ** $p<0.005$ *** $p<0.0005$

3-oxo-C12 :2 is associated with gut microbiota profile

Fecal microbiota composition in IBD patients

As expected we observed a loss in alpha-diversity of gut microbiota in IBD patients compared to HS (figure 4A, 4B). Beside a loss in biodiversity, changes in bacterial composition in IBD during remission and flare were comparable with previously described dysbiosis (figure 4C, 4D). They were characterized by a loss in Firmicutes (especially Lachnospiraceae and Ruminococcaceae) and an expansion in Proteobacteria. Moreover, principal component analysis of microbiota sequencing data showed a different repartition in HS compared to IBD patients in remission and in flare (figure 5).

Real time qPCR analysis confirmed 16S sequencing data showing dysbiosis among IBD patients especially in flare (Table S2). There was significantly lower counts of *Clostridium coccoides* and *Faecalibacterium prausnitzii* and significantly higher concentrations of *Bacteroidetes* and *Escherichia coli* in IBD patients in flare compared to HS. *Clostridium leptum* group was significantly less represented in IBD patients in flare and also in remission compared to HS.

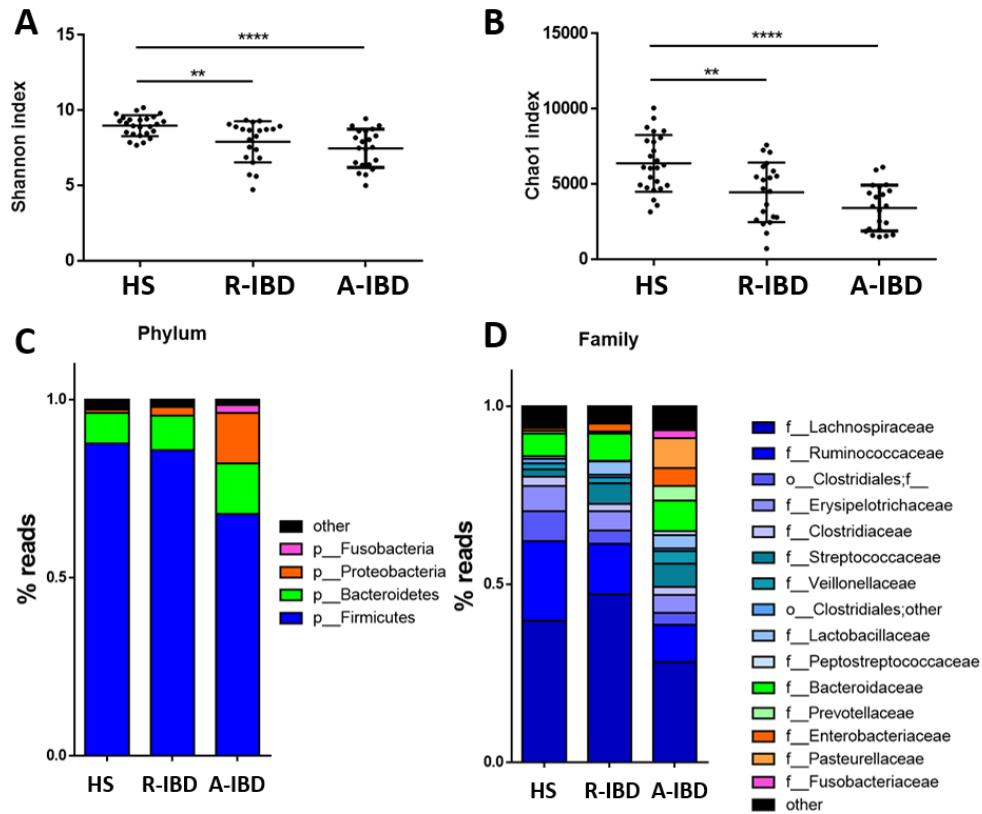


Figure 4. Bacterial diversity and composition among healthy subjects (HS), IBD in remission (R-IBD) and in flare (A-IBD): alpha diversity Shannon index (A) and Chao1 index (B) and composition at a phyla scale (C) and at family scale (D).

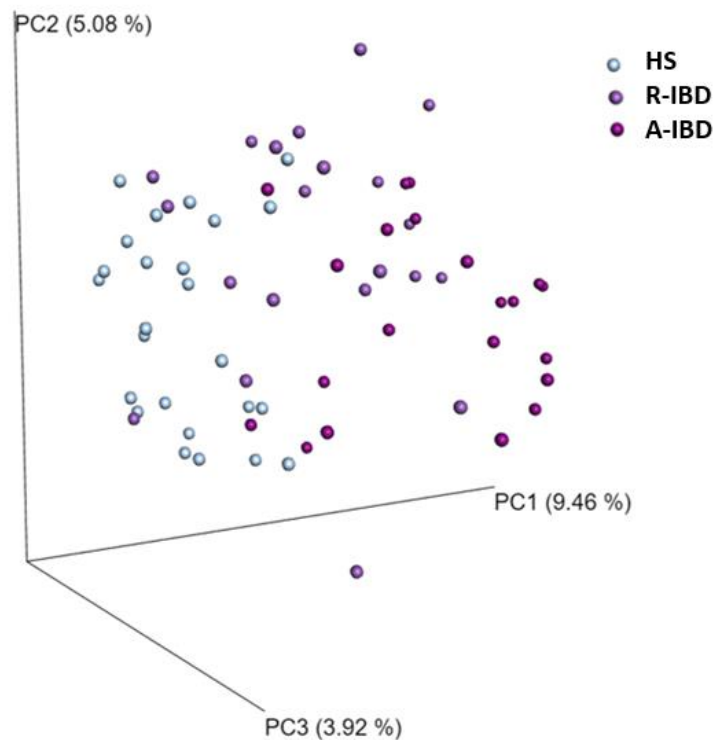


Figure 5. Beta diversity according to Bray Curtis index between healthy subjects (HS) and IBD in remission (R-IBD) and in flare (A-IBD).

3-oxo-C12:2 correlates with normobiosis

We analyzed fecal microbiota composition in fecal samples in which 3-oxo-C12:2 was present compared to those in which it was not detected. Principal component analysis of microbiota sequencing data showed a different distribution according to 3-oxo-C12:2 status as shown in figure 6A. As shown on Lefse analysis, main contributors to discriminate bacterial group where 3-oxo-C12:2 is seen were increase in Erysipelotrichaceae, Ruminococcaceae, Roseburia, Blautia, Lachnospiraceae and Faecalibacterium prausnitzii (Figure 6B). Altogether, our results suggest that 3-oxo-C12:2 correlates positively with normobiosis. To validate this hypothesis, we performed correlation tests using first 16S sequencing and then qPCR data. From sequencing data, 3-oxo-C12:2 correlates positively with Lachnospiraceae (such as Anaerostipes, Roseburia and Blautia), Coriobacteriaceae and Ruminococcaceae (such as Faecalibacterium prausnitzii). It correlates negatively with Fusobacteriaceae and Veillonellaceae (table S3).

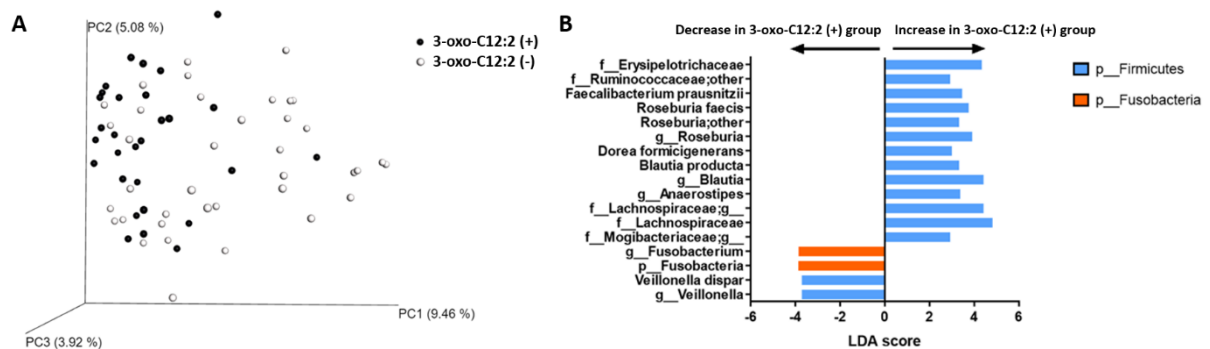


Figure 6. Bacterial composition among fecal samples according to AHL 3-oxo-C12:2 detection (3-oxo-C12:2 (+) group) or absence AHL 3-oxo-C12:2 (3-oxo-C12:2 (-) group). A : Beta diversity according to Bray Curtis index between the two groups. B: Bacterial taxa that were differentially represented in 3-oxo-C12:2 (+) group, with statistical level of significance according to linear discriminant analysis (LDA score >2). Taxa were identified at the order, family, gender or species level and colour-coded according to their phylum.

In a targeted and more quantitative manner, presence of 3-oxo-C12:2 was associated with significantly higher counts of Firmicutes (*C. coccoides* and *C. leptum* group and especially *F. prausnitzii*) and lower counts of *E. coli* as shown in figure 7.

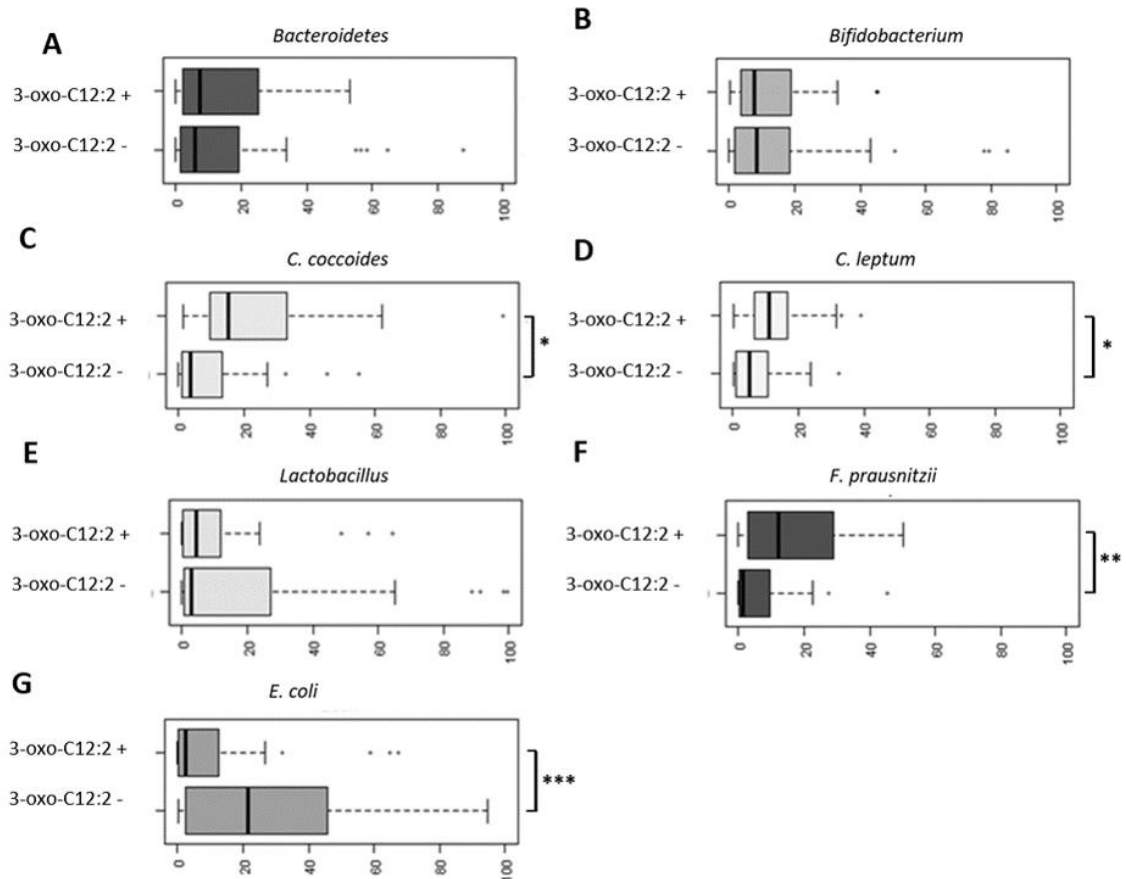


Figure 7. Relative quantification ($2^{-\Delta\Delta CT}$) of gut microbiota principal bacterial groups and species according to the presence (3-oxo-C12:2 +) or absence (3-oxo-C12:2 -) of AHL 3-oxo-C12:2. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ *** $p < 0.001$

3-oxo-C12:2 exerts protective effect on gut epithelial Caco-2 cells

Effect of 3-oxo-C12 :2 on inflammatory response in Caco-2 cells

We observed an anti-inflammatory effect of 3-oxo-C12:2 at 10, 25 and 50 μM as well as 3-oxo-C12 at 5 μM compared to control (figure 8).

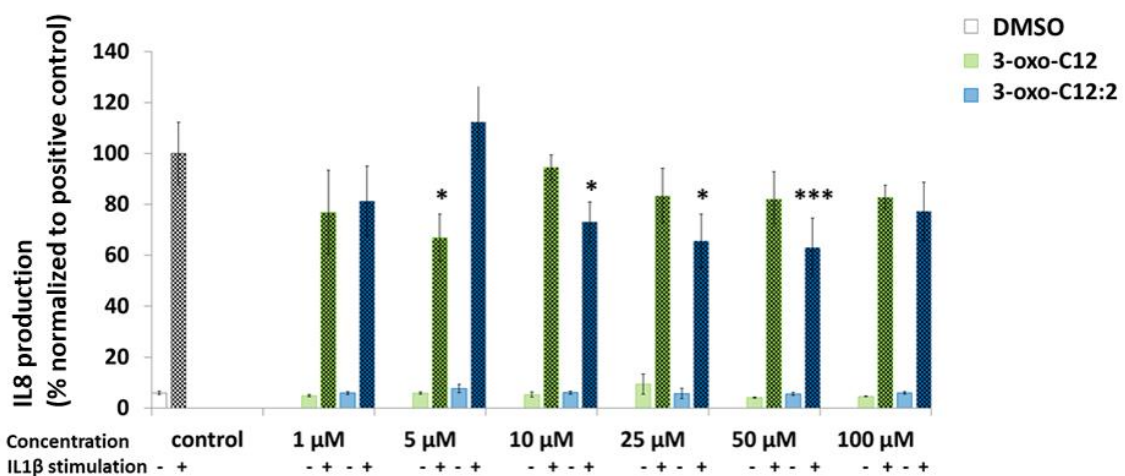


Figure 8. IL-8 (normalized ratio) secretion by Caco-2 cells before and after IL1 β stimulation with increasing concentrations of AHLs 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 compared to control (DMSO 0,1%). * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

Effect of 3-oxo-C12:2 on paracellular permeability in Caco-2 cells

There was an increase of paracellular permeability after 4 hours exposure (X2, non significant) and 20 hours exposure (X15, $p < 0.01$) to 3-oxo-C12 compared to control (figure 9). Interestingly, 3-oxo-C12:2 showed no modification of paracellular permeability in the same conditions.

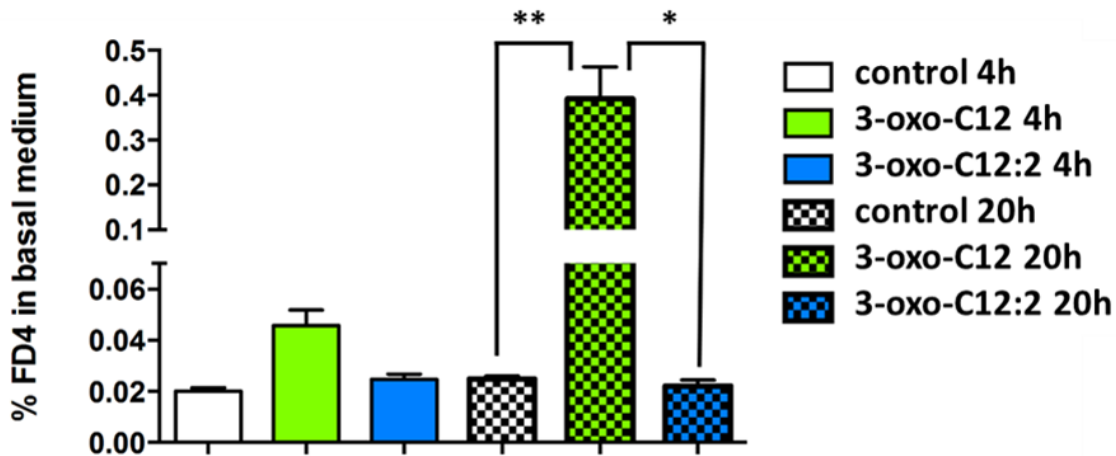


Figure 9. Proportion of FD4-FITC in the basal medium after 4 hours on Caco-2 cells cultured on transwell. Cells were pre-exposed with AHLs 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 at 200 μ M for 4 and 20 hours. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

DISCUSSION

In this study, we succeeded in identifying for the first time AHLs in human gut microbiota. Moreover, we discovered a new AHL, namely AHL 3-oxo-C12:2 which was prominent in gut ecosystem. This AHL correlates with healthy state normobiosis and was lost in IBD patients especially in flare. Finally, we were able to show that this molecule exerts protective effect on gut epithelial cells through anti-inflammatory effect without increasing paracellular permeability.

In fact, QS involving AHLs had been described in various ecosystems[36,37] and also in gut pathogens[38] but never in intestinal microbiota. In 2013, Swearingen et al addressed the question: Are There Acyl-Homoserine Lactones within Mammalian Intestines?[27] They ventured the hypothesis that AHLs were produced within the complex microbial communities of the human intestinal tract even though it had never been detected. After developing an original extraction method specifically for complex feces samples, the sensitivity of mass spectrometry enabled us to confirm this hypothesis. Actually, the first and most challenging step of this work was to determine the best extraction method with two major concerns: first to catch the largest rank of AHLs that exhibit variable hydrophobicity, second to extract a small molecule in a complex and solid sample with tremendous number of molecules. After many experiments, we eventually defined a two steps extraction beginning with solid-liquid extraction using a soxhlet followed by solid phase extraction taking into consideration the amphiphilic properties of AHL. We thus identified a prominent AHL in human gut microbiota and high-resolution mass spectrometry allowed us to determine its precise mass and therefore its chemical formula: 3-oxo-C12:2. We discovered a never identified before AHL 3-oxo-C12:2 which is prominent in human gut microbiota using an innovative technic. Still some limitations can be raised about other AHL which could have not been detected because of a lower

extraction yield with our technic. Also, some uncertainty persists about the molecule 3-oxo-C12:2 as we could not determine the position and the isomer (cis or trans) of the two double bounds. To go further, we need to display larger quantity of 3-oxo-C12:2 and go beyond technological lock. For example, one can determine by GC-MS/MS after derivation the position of the double bound in the acyl side chain by DMDS (dimethyl disulfure) method[39]. These kind of experiments remains challenging. Even though some other AHL may have been missed by our extraction technic, the detection of 3-oxo-C12:2 in gut microbiota from human samples is relevant. Indeed, its concentration in a cohort of IBD patients and healthy controls was associated with healthy state and normobiosis. Thanks to a translational strategy built on a well phenotyped IBD cohort and expertise of gut microbiota analysis, we bring an original result on gut ecosystem. Moreover considering that AHLs production is linked to the quorum state of microbial communities, we believe that this type of molecules is informative when studying the functional consequences of microbiota imbalance.

Our exploratory study raises some fundamental questions about the place of AHL 3-oxo-C12:2 in human gut microbiota: which bacterial species or family can synthetize it? Which ones recognize it? Could it influence the balance of gut microbiota and in which way? Analysis of microbiota sequencing data began to address these questions. It showed a correlation between 3-oxo-C12:2 and some bacterial species or family (mostly Firmicutes) but none of them was strong enough to identify a bacterial candidate for 3-oxo-C12:2 synthesis nor a bacterial target. A possible explanation is that AHL 3-oxo-C12:2 is a final product of a trophic chain involving several different bacterial species from gut microbiota. A simple LuxI/LuxR type of quorum sensing as described in a single bacterial species population is unlikely to happen as is in a complex ecosystem such as gut microbiota. Besides, the relative complexity of AHL 3-oxo-C12:2 (long acyl side chain, two double bonds) is compatible with a several step synthesis. A thorough bioinformatic analysis of AHL synthase, AHL receptor and desaturase genes in gut microbiota genome could be used as a strategy to identify bacterial candidates. This experimental plan has been used in marine ecosystem[37]. Furthermore, administration of 3-oxo-C12:2 in a murine model could help figure out the potential role of this AHL on regulation of microbial communities. Our hypothesis is that quorum sensing and more precisely the lack of 3-oxo-C12:2 could be a factor influencing the persistence of dysbiosis in IBD.

Beyond these ecological considerations, discovery of 3-oxo-C12:2 as a prominent AHL of the gut ecosystem invited us to test biological role on host showing a protective effect of 3-oxo-C12:2 on gut epithelial cells. Pragmatically, we decided to synthetize a 3-oxo-C12:2 with the most likely position of double bounds. We felt confident to show an anti-inflammatory effect of 3-oxo-C12:2. In fact, structurally close AHL 3-oxo-C12 produced by *Pseudomonas aeruginosa* has been previously described to be anti-inflammatory on several cell types different from epithelial cells[40–42]. Furthermore, it has also been shown that AHLs with a chemical structure close to 3-oxo-C12-AHL (long acyl chain, oxo substitution, intact lactone ring moiety...) present a similar anti-inflammatory effect[43]. We found an anti-inflammatory effect of both 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 on Caco-2 cells without visible cytotoxicity. We took into account PON expression in this cell type and therefore we use a selective PON inhibitor to assess anti-inflammatory effect and thus preserved the lactone ring moiety. To note integrity of lactone ring moiety is fundamental for AHL anti-inflammatory effect. 3-oxo-C12:2 exerts anti-inflammatory effect at a higher concentration than 3-oxo-C12 but in a wider range of concentrations. This suggests that the two double bonds by favouring folding contribute to an increase stability of this AHL. If immunomodulatory effect of 3-oxo-C12 has been well described, AHL receptor and molecular partners in host cells still needs to be precised. It has been suggested that this effect results from the interaction of AHLs with PPAR within host cell[44].

Exploring other potential effects of AHLs on Caco-2 cells, we confirmed that 3-oxo-C12 increases paracellular permeability [45,46]. Indeed, this AHL secreted by a pathogen is a part of the invasion strategy of the host. The most striking result is that structurally close but unsaturated 3-oxo-C12:2 does not modify paracellular permeability. Increased epithelial permeability also called “leaky gut”[47] is a very early phenomenon in IBD pathophysiology. It has been described in first degree relatives without clinical symptoms[48], it could be very appealing to explore if 3-oxo-C12:2 could partly restore intestinal epithelial barrier.

These results pave the way to use 3-oxo-C12:2 as an ecological immunomodulator. One can speculate that this prominent AHL in case of IBD associated dysbiosis could both restore normobiosis and have an anti-inflammatory effect without increasing permeability. Manipulation of gut microbiota in order to control inflammation in IBD has been strongly investigated in the past few years. This has led to use with success fecal microbiota transplantation in IBD especially in UC [49,50]. This drastic method is not completely satisfactory and exposes patients to potential long term risks[51]. Besides, antibiotics have been showed to be efficient in IBD in specific situations (post-operative recurrence, pouchitis, perianal lesions). However it raises concerns about antibiotics resistance and should not be use in long lasting diseases such as IBD. Probiotics have failed to reach significant efficacy to be use in IBD[52,53]. In this setting, future developments will probably come from natural products from gut microbiota to control gut inflammation. In this therapeutic perspective, 3-oxo-C12:2 through its dual effect on host and microbiota appears as a good candidate. Our results as a proof of concept constitute the first step towards ecological therapeutic approach in IBD.

CONCLUSION

In conclusion, using state of the art mass spectrometry in a targeted strategy, we were able for the first time to investigate quorum sensing molecules such as AHLs from human gut microbiota. We discovered a new and prominent AHL, 3-oxo-C12:2, in gut microbiota that exhibits protective effect on gut epithelial cells. These innovative results contribute to improve our knowledge in human gut host-microbiota interactions. Through a translational approach, we explored the potential effects of the loss of 3-oxo-C12:2 in IBD-associated dysbiosis and in gut epithelial inflammation. In the field of ecological therapeutic approach in IBD, our results should be considered as a cornerstone for a new concept to control gut inflammation and to manipulate gut microbiota.

Acknowledgements: Authors wish to thank Gerard Bolbach and Gilles Clodic from Institut de Biologie Paris Seine/FR 3631, Plateforme Spectrométrie de masse et Protéomique, for high resolution mass spectrometry experiment and Dr P. Williams (University of Nottingham) for providing the bacterial strain *Agrobacterium tumefaciens* NTL4. They also wish to thank Solange Lavielle and Gérard Chassaing for chemical analysis and Thomas Bazin, Mélanie Clément, Hajar Nsiri and Cécile Poret for technical assistance.

Contributors: CL, JPG, EQ and PS designed the experimental plan. CL, EQ and PS wrote the manuscript. HS supervised microbiota analysis. ST supervised permeability assays. JMM supervised chemical analysis. MAM and DR supervised mass spectrometry. LBr, LH and EL provided technical support. WC contributed to statistical analysis. LBe, CL, HS and PS recruited patients and controls. All authors took part in the revision of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from Biocodex, ECCO (European Crohn's and Colitis Organization) grant, the Association François Aupetit, Fondation pour la recherche médicale and SNFGE (Société française de gastroentérologie).

Competing Interests: Beside the cited grants, all the author declare competing interest outside the submitted work. Dr Landman has received personal fees from Abbvie and Hospira and travel support from Abbvie, Hospira, Mayoly Spindler, Biocodex and Takeda. Prof Beaugerie has received consulting fees from Janssen, lecture fees from Abbvie, Janssen, MSD, Ferring Pharmaceuticals, Takeda, and research support from Abbvie, Ferring Pharmaceuticals, Hospira-Pfizer, Janssen and Takeda. Prof Sokol has received personal fees from Danone, MSD, Takeda, Abbvie, Astellas, BMS and Novartis, options from Enterome and Maat and grants from Biocodex. Prof Seksik has received personal fees from Takeda, Merck MSD, Biocodex and Abbvie and non-financial support from Takeda. The remaining authors disclose no conflict.

Ethics approval: Local ethics committee of Comite de Protection des Personnes Ile-de-France IV, IRB 00003835, Suivitheque study, registration number 2012/05NICB.

References

- 1 Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Colombel J-F, *et al.* The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am J Gastroenterol* 2010;**105**:289–97. doi:10.1038/ajg.2009.579
- 2 Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers Complicating Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 2015;**372**:1441–52. doi:10.1056/NEJMra1403718
- 3 Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2017;**152**:313–321.e2. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.020
- 4 Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, *et al.* Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;**140**:1785–94. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.055
- 5 McGovern DPB, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2015;**149**:1163–1176.e2. doi:10.1053/j.gastro.2015.08.001
- 6 Abreu MT. The genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* 2013;**9**:521–3.
- 7 Manichanh C, Borrueil N, Casellas F, *et al.* The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;**9**:599–608. doi:10.1038/nrgastro.2012.152
- 8 Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* 2017;**152**:327–339.e4. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.012
- 9 Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 2016;**14**:e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533
- 10 Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 2005;**308**:1635–8. doi:10.1126/science.1110591
- 11 Postler TS, Ghosh S. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell Metab* 2017;**26**:110–30. doi:10.1016/j.cmet.2017.05.008

- 12 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:16731–16736.
- 13 Manichanh C. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;**55**:205–11. doi:10.1136/gut.2005.073817
- 14 Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, *et al.* A microbial signature for Crohn’s disease. *Gut* 2017;**66**:813–22. doi:10.1136/gutjnl-2016-313235
- 15 Varela E, Manichanh C, Gallart M, *et al.* Colonisation by Faecalibacterium prausnitzii and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;**38**:151–61. doi:10.1111/apt.12365
- 16 Jostins L, Ripke S, Weersma RK, *et al.* Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;**491**:119–24. doi:10.1038/nature11582
- 17 Duboc H, Rajca S, Rainteau D, *et al.* Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013;**62**:531–9. doi:10.1136/gutjnl-2012-302578
- 18 Quévrain E, Maubert MA, Michon C, *et al.* Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn’s disease. *Gut* 2016;**65**:415–25. doi:10.1136/gutjnl-2014-307649
- 19 Jansson J, Willing B, Lucio M, *et al.* Metabolomics Reveals Metabolic Biomarkers of Crohn’s Disease. *PLoS ONE* 2009;**4**:e6386. doi:10.1371/journal.pone.0006386
- 20 Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 2001;**35**:439–68. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090913
- 21 Papenfort K, Bassler B. Quorum-Sensing Signal-Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2016;**14**:576–88. doi:10.1038/nrmicro.2016.89
- 22 Mitchell RJ, Lee S-K, Kim T-S, *et al.* Microbial linguistics: perspectives and applications of microbial cell-to-cell communication. *BMB Rep* 2011;**44**:1–10. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.1.1
- 23 Hawver LA, Jung SA, Ng W-L. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiol Rev* 2016;**40**:738–52. doi:10.1093/femsre/fuw014
- 24 Holm A, Vikström E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front Plant Sci* 2014;**5**. doi:10.3389/fpls.2014.00309
- 25 Teplitski M, Mathesius U, Rumbaugh KP. Perception and degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals by mammalian and plant cells. *Chem Rev* 2011;**111**:100–16. doi:10.1021/cr100045m
- 26 Cooley M, Chhabra SR, Williams P. N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing: A Twist in the Tail and a Blow for Host Immunity. *Chem Biol* 2008;**15**:1141–7. doi:10.1016/j.chembiol.2008.10.010

- 27 Swearingen MC, Sabag-Daigle A, Ahmer BMM. Are There Acyl-Homoserine Lactones within Mammalian Intestines? *J Bacteriol* 2013;**195**:173–9. doi:10.1128/JB.01341-12
- 28 Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, *et al.* Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis: *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:93–9. doi:10.1002/ibd.20582
- 29 Karban A, Hartman C, Eliakim R, *et al.* Paraoxonase (PON)1 192R Allele Carriage is Associated with Reduced Risk of Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci* 2007;**52**:2707–15. doi:10.1007/s10620-006-9700-5
- 30 Cataldi TRI, Bianco G, Abate S, *et al.* Identification of unsaturated N-acylhomoserine lactones in bacterial isolates of *Rhodobacter sphaeroides* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Unsaturated AHLs produced by *Rhodobacter sphaeroides*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;**25**:1817–26. doi:10.1002/rcm.5054
- 31 Cataldi TRI, Bianco G, Abate S. Profiling of N-acyl-homoserine lactones by liquid chromatography coupled with electrospray ionization and a hybrid quadrupole linear ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR-MS). *J Mass Spectrom* 2007;**43**:82–96. doi:10.1002/jms.1275
- 32 Cha C, Gao P, Chen YC, *et al.* Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* 1998;**11**:1119–29. doi:10.1094/MPMI.1998.11.11.1119
- 33 Sokol H, Seksik P, Furet JP, *et al.* Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota: *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:1183–9. doi:10.1002/ibd.20903
- 34 Sokol H, Leducq V, Aschard H, *et al.* Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 2017;**66**:1039–48. doi:10.1136/gutjnl-2015-310746
- 35 Segata N, Izard J, Waldron L, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;**12**:R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60
- 36 Boyer M, Wisniewski-DyÅ© F. Cell–cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum: Cell–cell signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;**70**:1–19. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00745.x
- 37 Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Toulza E, *et al.* Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling metagenomic database. *Aquat Microb Ecol* 2015;**74**:107–19. doi:10.3354/ame01734
- 38 Soares JA, Ahmer BM. Detection of acyl-homoserine lactones by *Escherichia* and *Salmonella*. *Curr Opin Microbiol* 2011;**14**:188–93. doi:10.1016/j.mib.2011.01.006
- 39 Moss CW, Lambert-Fair MA. Location of double bonds in monounsaturated fatty acids of *Campylobacter cryaerophila* with dimethyl disulfide derivatives and combined gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 1989;**27**:1467–1470.
- 40 Kravchenko VV, Kaufmann GF, Mathison JC, *et al.* Modulation of Gene Expression via Disruption of NF- B Signaling by a Bacterial Small Molecule. *Science* 2008;**321**:259–63. doi:10.1126/science.1156499

- 41 Ritchie AJ, Jansson A, Stallberg J, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule N-3-(Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone Inhibits T-Cell Differentiation and Cytokine Production by a Mechanism Involving an Early Step in T-Cell Activation. *Infect Immun* 2005;**73**:1648–55. doi:10.1128/IAI.73.3.1648-1655.2005
- 42 Glucksam-Galnoy Y, Sananes R, Silberstein N, *et al.* The Bacterial Quorum-Sensing Signal Molecule N-3-Oxo-Dodecanoyl-L-Homoserine Lactone Reciprocally Modulates Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Activated Macrophages. *J Immunol* 2013;**191**:337–44. doi:10.4049/jimmunol.1300368
- 43 Chhabra SR, Harty C, Hooi DSW, *et al.* Synthetic Analogues of the Bacterial Signal (Quorum Sensing) Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine Lactone as Immune Modulators. *J Med Chem* 2003;**46**:97–104. doi:10.1021/jm020909n
- 44 Cooley MA, Whittall C, Rolph MS. *Pseudomonas* signal molecule 3-oxo-C12-homoserine lactone interferes with binding of rosiglitazone to human PPAR γ . *Microbes Infect* 2010;**12**:231–7. doi:10.1016/j.micinf.2009.12.009
- 45 Eum SY, Jaraki D, Bertrand L, *et al.* Disruption of epithelial barrier by quorum-sensing N-3-(oxododecanoyl)-homoserine lactone is mediated by matrix metalloproteinases. *AJP Gastrointest Liver Physiol* 2014;**306**:G992–1001. doi:10.1152/ajpgi.00016.2014
- 46 Vikström E, Bui L, Konradsson P, *et al.* The junctional integrity of epithelial cells is modulated by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms. *Exp Cell Res* 2009;**315**:313–26. doi:10.1016/j.yexcr.2008.10.044
- 47 Quigley EMM. Leaky gut - concept or clinical entity? *Curr Opin Gastroenterol* 2016;**32**:74–9. doi:10.1097/MOG.0000000000000243
- 48 Teshima CW, Goodman KJ, El-Kalla M, *et al.* Increased Intestinal Permeability in Relatives of Patients With Crohn's Disease Is Not Associated With Small Bowel Ulcerations. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* Published Online First: 7 March 2017. doi:10.1016/j.cgh.2017.02.028
- 49 Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, *et al.* Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 2015;**149**:102–109.e6. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.001
- 50 Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, *et al.* Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 2017;**389**:1218–28. doi:10.1016/S0140-6736(17)30182-4
- 51 Pigneur B, Sokol H. Fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease: the quest for the holy grail. *Mucosal Immunol* 2016;**9**:1360–5. doi:10.1038/mi.2016.67
- 52 Sokol H. Probiotics and antibiotics in IBD. *Dig Dis Basel Switz* 2014;**32 Suppl 1**:10–7. doi:10.1159/000367820
- 53 Derwa Y, Gracie DJ, Hamlin PJ, *et al.* Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2017;**46**:389–400. doi:10.1111/apt.14203

SUPPLEMENTARY METHODS

AHL detection and characterization

Sample pretreatment and optimized protocols for AHL extraction

Each fecal sample was lyophilized for 72 hours and AHL were extracted from one gram of lyophilized feces according to the following steps:

- Solid-liquid extraction using a Soxhlet apparatus with 100 mL of HPLC-grade ethyl acetate (Carlo Erba) with 0.1% formic acid in which 2 μ L of the internal standard N-hexanoyl-L-homoserine lactone-d3 (C6d3-HSL, Cayman Chemical) at 20mM was added. The process was left to run for 4 hours after the first cycle.
- Evaporation to dryness of the extraction product using a rotatory evaporator and resuspended in 5 mL of HPLC-grade acetonitrile (Carlo Erba) with 0.1% formic acid. 45 mL of water with 0.1% formic acid was added to obtain a solution of 90% water/10% acetonitrile.
- Solid phase extraction: the sample was loaded onto a reverse phase C18 cartridge (Sep-Pak Waters 12cc 2g) after pre-conditioning with 15 mL of methanol with 0.1% formic acid and 30 mL of water with 0.1% formic acid. The cartridge was rinsed successively with 50 mL of water 90%/acetonitrile10% with 0.1% formic acid and with 10 mL of hexane. The AHL were then eluted with 20mL methanol with 0.1% formic acid.
- Evaporation to dryness of the elution product under a nitrogen stream at 50°C. The residue was dissolved in 200 μ L of acetonitrile with 0.1% formic acid.

AHL detection by High pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

The column was thermostated at 45 °C. Five μ L of the final extraction product was injected into the HPLC-MS/MS. The mobile phases consisted of (A) (water with 0.1% formic acid) and (B) (acetonitrile with 0.1% formic acid) 80:20 (v/v). The linear gradient for AHL elution was programmed as follow: increasing B in A from 20 to 35 for 5 minutes and from 35 to 95 for 15 minutes, gradient remained then constant over 10 minutes. Separation was achieved at a flow rate of 0.4 mL/min. Prior to the next injection, the column was equilibrated for 15 minutes.

ESI interface set in the positive mode with nitrogen as the nebulizer gas. The ion source temperature was set at 350 °C. Declustering and entrance potentials were set at 60 V and 5000 V, respectively.

As described by Cataldi *et al* [31], precursor ions were all different AHL $[M+H]^+$ and product ions were according to the 2 different fragmentation reactions : neutral loss $[M+H -101]^+$ and the lactone moiety at m/z 102.

AHL characterization

AHL biosensor

A preculture of the bacterial strain *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, kindly provided by Dr P. Williams' lab (University of Nottingham), was grown overnight in Luria Bertani (LB) medium supplemented with gentamycin (30 μ g/ml) with shaking (70 rpm) at 30°C. AB medium supplemented with 0.5% glucose and thiamine (1mg/l) was inoculated with 1/50 volume of the overnight preculture, and grown to late exponential phase to obtain an OD₆₀₀ of 0.6 (after 14 to 15 hours). The culture was then centrifuged (at 1700g for 15min, at 4°C) and the bacterial pellet was resuspended in AB medium with a 20-fold concentration. This bacterial suspension was diluted (1/100) in melted soft agar (0.7%) AB medium with X-gal (final concentration 50 μ g/ml) [32]. The agar-culture solution was

immediately poured into a petri dish containing solid LB agar. Twenty microliters of sample, negative (water) and positive controls (standard AHLs) were pipette into different wells punched into the solidified agar. The plates were incubated in the dark at 30°C for 24-48h before visualization of the blue coloration around the wells.

Microbiota analysis

Real time qPCR

Amplification and detection were carried out in 96-well plates with SYBR Green PCR Master Mix (2X). Each reaction was performed in duplicate. Amplifications were performed at 95°C for 10 min to denature DNA and activate AmpliTaq Gold Polymerase followed by 40 cycles at 95°C for 30 s and 60°C for 1 min (61°C for 1 min to quantify total bacteria). A dissociation step was added, and the dissociation curves were analyzed to confirm the identity and fidelity of amplification of the SYBR Green products.

SUPPLEMENTARY TABLES

Target	Primer	Sequence 5'-3'
All bacteria	F_Bact 1369	CGG TGA ATA CGT TCC CGG
	R_Prok 1492	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T
<i>Bacteroides</i>	Bacter 11	CCT WCG ATG GAT AGG GGT T
	Bacter 08	CAC GCT ACT TGG CTG GTT CAG
<i>Coccoides</i>	Ccoc 07	GAC GCC GCG TGA AGG A
	Ccoc 14	AGC CCC AGC CTT TCA CAT C
<i>Clostridium leptum</i>	Clept 09	CCT TCC GTG CCG SAG TTA
	Clept 08	GAA TTA AAC CAC ATA CTC CAC TGC TT
<i>Bifidobacterium</i>	F_bifid 09c	CGG GTGAGT AAT GCG TGA CC
	R_bifid 06	TGA TAG GAC GCG ACC CCA
<i>Lactobacillus</i>	Lacto 04	CGC CAC TGG TGT TCY TCC ATA
	Lacto 05	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A
<i>Faealibacterium prausnitzii</i>	F.Prau 07	CCA TGA ATT GCC TTC AAA ACT GTT
	F.Prau 02	GAG CCT CAG CGT CAG TTG GT
<i>Escherichia coli</i>	E. Coli F	CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA
	E. Coli R	CGG GTA ACG TCA ATG ATG AGC AAA

Table S1. Group and species-specific 16S rRNA-targeted primers and their sequences

	HS (n=26)	R-IBD (n=24)	A-IBD (n=25)	p-value		
				HS vs R-IBD	HS vs A-IBD	R-IBD vs A-IBD
All bacteria (log/g of feces)	11.91 +/- 0.09	11.72 +/- 0.10	11.68 +/-0.09	ns	ns	ns
<i>Bacteroidetes</i>	0.92 +/-0.20	1.45 +/-0.60	3.22 +/- 0.79	ns	0.042	ns
<i>Bifidobacterium</i>	1.06 +/- 0.25	4.87 +/- 1.92	6.73 +/- 5.77	ns	ns	0.029
<i>C. coccoides</i>	0.99 +/- 0.15	2.77 +/- 0.94	0.91 +/- 0.42	0.038	0.015	0.0003
<i>C. leptum</i>	1.02 +/- 0.11	0.98 +/- 0.24	0.55 +/- 0.14	ns	0.0005	ns
<i>Lactobacillus</i>	1.06 +/- 0.42	13.34 +/- 9.76	26.38 +/- 23.26	ns	ns	ns
<i>E. coli</i>	1.05 +/- 0.41	1.67 +/- 0.81	13.92 +/- 4.11	ns	<0.0001	<0.0001
<i>F. prausnitzii</i>	1.00 +/- 0.20	1.55 +/- 0.46	0.47 +/- 0.15	ns	0.005	ns

Table S2. Quantification of dominant and subdominant bacteria in the fecal microbiota (Log₁₀ CFU Equivalent/g of feces) from IBD patients in remission (R-IBD) and flare (A-IBD) and healthy controls (HS). P-value of comparisons between each group are shown in the last three columns.

Taxa	Spearman ρ	p value
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Anaerostipes;s__	0,48927007	0.001
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Roseburia;Other	0,42245372	0.005
p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__;s__	0,3882074	0.01
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__;s__	0,3751996	0.01
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Roseburia;s__faecis	0,3720511	0.01
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Faecalibacterium;s__prausnitzii	0,35554197	0.02
p__Fusobacteria;c__Fusobacteriia;o__Fusobacteriales;f__Fusobacteriaceae;g__Fusobacterium;s__	-0,3554251	0.02
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__[Mogibacteriaceae];g__;s__	0,35476241	0.02
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Blautia;s__	0,35101284	0.02
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;Other;Other	0,34656497	0.02
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea;s__formicigenerans	0,34594418	0.02
p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__durum	0,33126643	0.03
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Veillonellaceae;g__Veillonella;s__dispar	-0,3278163	0.03
p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__;s__	0,31502506	0.04

Table S3. Significant correlations (non-parametric Spearman's test) between 3-oxo-C12:2 concentration and bacterial taxa from 16S sequencing. In the first column, taxa were identified at the order, family, genus or species level. Spearman coefficient is shown in the second column and p-value in the third column.

II. RESULTATS COMPLEMENTAIRES *IN VITRO* ET *IN VIVO* SUR L'EFFET DES AHLS 3-OXO-C12 ET 3-OXO-C12 :2

Les résultats supplémentaires présentés ci après ne font pas seuls l'objet d'une publication mais font suite à l'article princeps qui précède. Ces résultats seront intégrés à une prochaine publication en association à d'autres expérimentations en cours. Ils concernent les effets *in vitro* et *in vivo* des AHLS 3-oxo-C12 et 3-oxo-C12 :2.

II.A. Résultats préliminaires avec la 3-oxo-C12 sur les cellules immunitaires

II.A.1. Matériel et méthodes

Les cellules Raw 264.7 ont été cultivées dans des plaques 6 puits (Falcon®), dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) glutaMAX 1X (Gibco®), avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) (GE Healthcare®) décomplémenté, à 37°C avec 10% de CO₂. Le milieu de culture a été changé toutes les 48h jusqu'à atteindre 70 à 80% de confluence. Le milieu de culture a été ensuite changé pour du DMEM sans SVF 1h avant le début de l'expérimentation. Puis le contrôle (DMSO 0,1%) ou des concentrations croissantes 3-oxo-C12 (1, 5 ou 10µM) dans du DMSO 0,1% a été ajouté, avec 0,1% de BSA (bovin serum albumin) délipidée. Chaque condition était réalisée avec et sans 2-hydroxyquinoline (2HQ), inhibiteur sélectif des PON, à la concentration de 100µM. Les cellules étaient dans le même temps stimulées par l'adjonction de LPS à la concentration de 50ng/ml et d'IFN γ à la concentration de 20UI/ml. Chaque condition était réalisée en duplicat.

Après 6 heures d'incubation à 37°C avec 10% de CO₂, les surnageants étaient récupérés pour dosage de l'IL-6 et du TNF alpha par méthode ELISA et le culot cellulaire était récupéré pour dosage de protéines. La réponse des cellules Raw264.7 était donc évaluée par les taux de TNF- α et l'IL-6 dans le surnageant après 6h et exprimés en pg/mg protéines.

II.A.2. Résultats

Nous avons mis en évidence une diminution significative de l'IL-6 en présence de 3-oxo-C12 à la concentration de 5µM et de 2HQ par rapport au témoin négatif (DMSO + 2HQ) : 23208 +/- 4639 vs 95373 +/-12875 pg/mg de protéines, $p = 0,03$ (figure 15). On observait également une diminution du TNF- α dans les mêmes conditions sans que cela atteigne la significativité. Néanmoins, ces résultats étaient peu reproductibles du fait de la faible adhérence des cellules Raw264.7. Par ailleurs l'effet anti-inflammatoire significatif était limité à la concentration de 5µM.

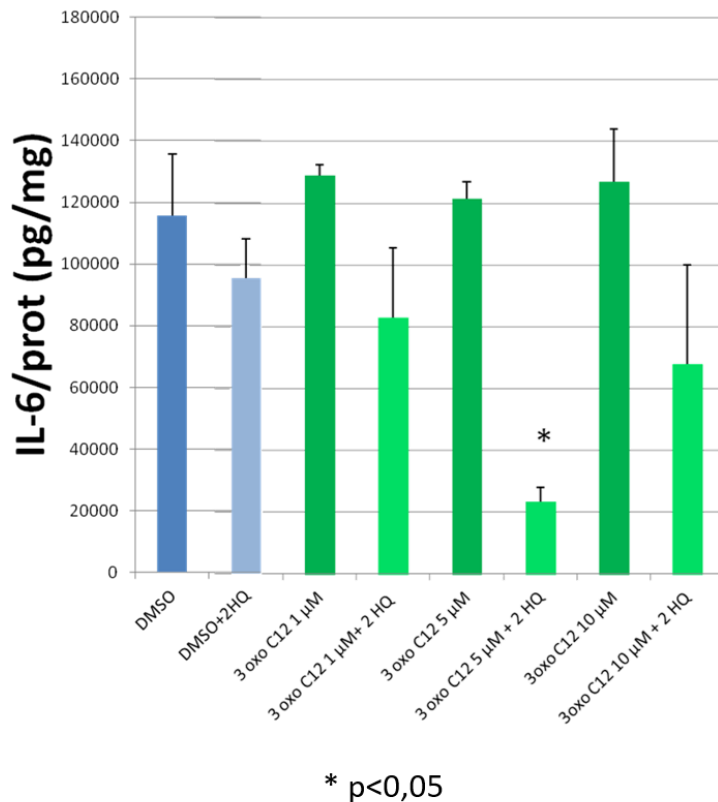


Figure 15. Effet anti-inflammatoire de la 3-oxo-C12 sur les cellules Raw 264.7

II.B. Imagerie cellulaire : localisation de l'AHL 3-oxo-C12 dans les cellules intestinales Caco-2

II.B.1. Matériel et méthodes

Les cellules Caco-2 ont été cultivées sur des lamelles déposées au fond des puits de plaques 6 puits (Falcon®), dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) glutaMAX 1X (Gibco®), avec 20% de sérum de veau foetal (SVF) (GE Healthcare®) décomplémenté, 1% d'acides aminés non essentiels 100X (Gibco®) et 1% de pénicilline/streptomycine 100X (PAA company®), à 37°C avec 10% de CO₂. Le milieu de culture a été changé toutes les 24h jusqu'à atteindre 70 à 80% de confluence.

Le milieu de culture a été ensuite changé pour du DMEM sans SVF 15 minutes avant le début de l'incubation. Puis il était ajouté :

- Soit la 3-oxo-C12 couplée à la fluorescéine ou N-dodecanoyl-L-homoserine lactone-3-hydrone-fluoresceine (3O12-FITC) (Cayman chemicals®) à la concentration finale d'1µM dans du DMSO (0,1%) avec 0,1% de BSA (bovin serum albumin)

- Soit la 3O12-FITC à 1µM et la 3-oxo-C12 (Sigma-Aldrich®) à 5 ou 20 µM dans du DMSO (0,1%) avec 0,1% de BSA
- Soit le contrôle : la 5(6)-carboxyfluoresceine (Sigma-Aldrich®) à 1µM dans du DMSO 0,1% avec 0,1% de BSA

Chaque condition était réalisée en duplicat.

Après 30 minutes d'incubation à 37°C avec 10% de CO₂, les lamelles étaient récupérées et les cellules étaient fixées. Un marquage en 2 temps était effectué. Selon les conditions, il y avait :

- Un marquage des membranes : la lectine Wheat Germ agglutinin (WGA) marquée à la rhodamine (Life Technologies©) était ajoutée à la concentration de 20 ng/ml pendant 15 minutes. Après 3 lavages au PBS 1X, la lamelle était recouverte de paraformaldéhyde (PFA) 2% pendant 15 minutes pour fixation.
- Un marquage des noyaux : après rinçage au PBS 1X, la lamelle était recouverte de 150µL de DRAQ5 (5µM) pendant 10 minutes. Puis la lamelle était rincée au PBS 1X.
- Un immunomarquage de l'euchromatine : perméabilisation par une solution Triton 1X saponine 0,075% pendant 10 minutes, rinçage au PBS 1X puis blocage par PBS1X/BSA 1% pendant 30 minutes, ajout de l'anticorps primaire anti-histone H3 (Abcam©) à la dose de 9µg/ml, puis après 2 rinçages (PBS 1X 5 minutes puis PBS1X/BSA 1% 5 minutes, ajout de l'anticorps secondaire Alexa Fluor 647 anti-lapin (Life Technologies©) au 1/400^e.

Après ajout de 20µL de DABCO, les lamelles étaient montées sur lames et visualisées au microscope confocal Leica TCS spectral (SP2) après 1h minimum à 4°C. Un laser mixte krypton-argon était utilisé pour l'excitation des lames avec les longueurs d'ondes suivantes : 488 nm pour le FITC (vert), 543 nm pour la lectine WGA marquée à la rhodamine (rouge), et 633 nm pour le DRAQ 5 et l'immunomarquage de l'euchromatine (bleu). Les images obtenues étaient fusionnées puis corrigées à l'aide du logiciel Gimp.

II.B.2. Résultats

Nous avons pu observer que l'AHL était présente en intracellulaire après 30 minutes, à la fois au niveau cytoplasmique mais aussi au niveau nucléaire plus particulièrement au niveau de certaines zones du noyau (figure 16A). Après immunomarquage avec l'anticorps anti-histone H3, on observait une co-localisation avec l'euchromatine (figure 16B). Cela suggère que la 3O12-FITC se localise au niveau des zones de transcription. On n'observait pas de fluorescence intracellulaire avec la 5(6)-carboxyfluoresceine (témoin négatif) (figure 16 C), ce qui confirme que ce n'est pas la fluoresceine

qui permet à la 3O12-FITC de rentrer dans la cellule et de se localiser dans le noyau. La fluorescence diminuait surtout au niveau nucléaire après addition dans le milieu de 3-oxo-C12 non fluorescente en excès à 5 mais surtout à 20 μM (figure 16D). Cela montre que l' AHL 3-oxo-C12 rentre en compétition avec la 3O12-FITC, notamment par rapport à un potentiel récepteur nucléaire. L'ajout de la fluorescéine, bien que volumineuse, ne semble pas modifier de manière significative la localisation de l' AHL dans la cellule.

Ces résultats suggèrent que la 3-oxo-C12 joue un rôle de facteur transcriptionnel chez l'hôte.

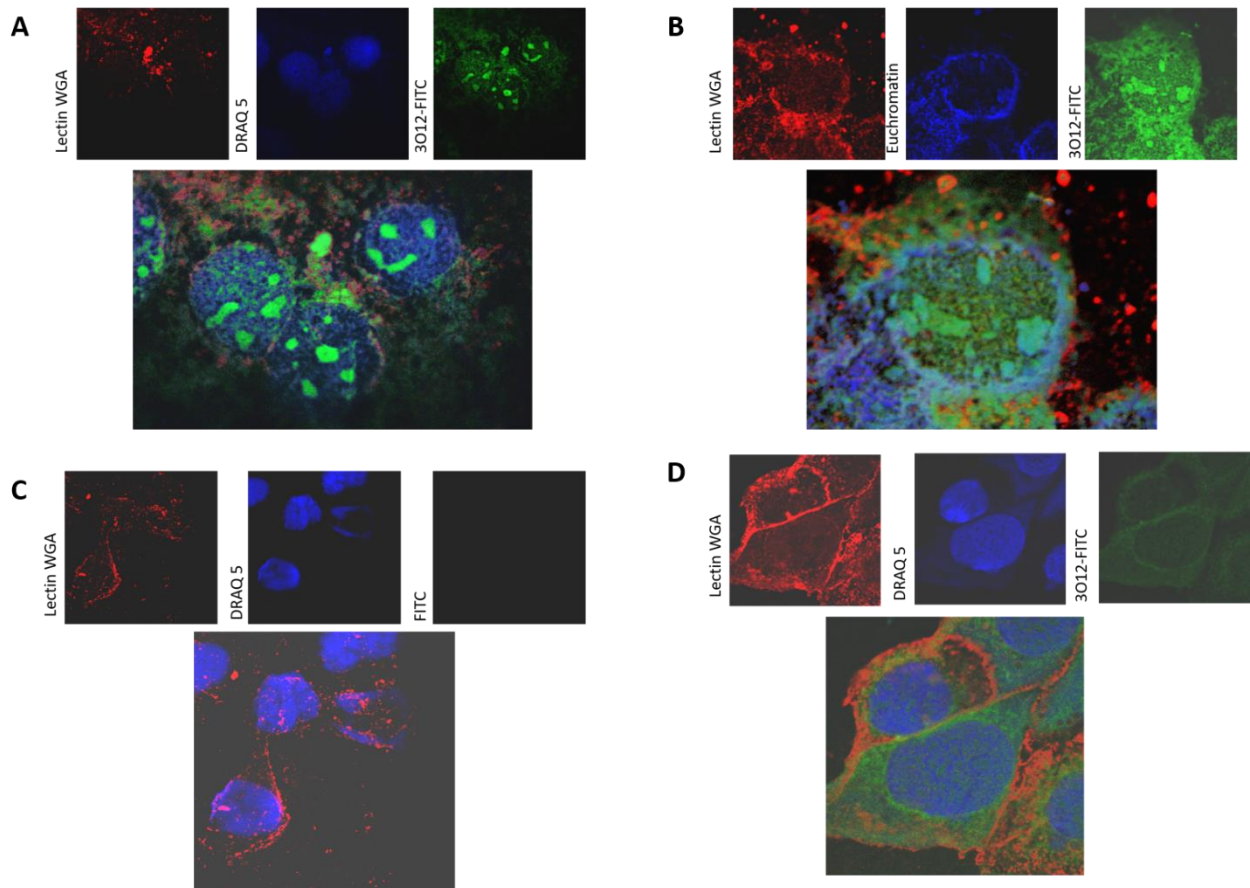


Figure 16. Localisation cellulaire de l' AHL 3-oxo-C12-FITC

A : 3O12-FITC (vert) avec marquage par la lectine WGA (rouge) et le DRAQ5 (bleu)

B : 3O12-FITC (vert) avec marquage par la lectine WGA (rouge) et immunomarquage anti-histone H3 (bleu)

C : carboxyfluoresceinte (FITC) (vert) avec marquage par la lectine WGA (rouge) et le DRAQ5 (bleu)

D : 3O12-FITC (vert) et 3-oxo-C12 à 20 μM avec marquage par la lectine WGA (rouge) et le DRAQ5 (bleu)

II.C. Influence de la 3-oxo-C12 et de la 3-oxo-C12 :2 sur le microbiote *in vivo*

II.C.1. Matériel et méthodes

II.C.1.a. Animaux

Des souris males C57BL/6JRj (âgés de 6 à 8 semaines ; Janvier, Le Genest Saint Isle, France) ont été hébergées au sein de l'unité « Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons » (IERP) de l'Institut National pour la Recherche Agronomique (INRA) de Jouy en Josas en conditions spécifique pathogen-free (SPF). Elles ont été laissées en acclimatation pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. L'ensemble de l'essai s'est déroulé en conditions standard (cycle jour/nuit de 12h/12h, température de 21°C). Les expérimentations se sont déroulées conformément à la législation avec l'accord d'un comité éthique local et approuvé par le ministère de la recherche (numéro d'autorisation de projet 3445-2016010615159974).

Pendant 3 semaines, des groupes de 4 animaux ont reçu quotidiennement par voie orale des doses de 200µl d'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12 :2 solubilisées dans du DMSO 0.1% correspondant à 10, 5, 1 ou 0 mg d'AHL/kg de poids vif. Des fécès ont été collectés, pesés puis congelés à -80°C tous les deux jours. Pour chaque groupe, les selles ont été regroupées pour l'analyse à J0, J7, J14 et J21 pour chaque condition. Les deux expériences se sont déroulées à 2 périodes différentes avec la 3-oxo-C12 ou avec la 3-oxo-C12 :2.

II.C.1.b. Extraction d'ADN bactérien

Sur les selles de souris congelées, 250µL de guanidine thiocyanate (GT) 4M Tris-HCl pH7.5, 0.1M et 40µL de N-Lauroyl Sarcosine (LS) 10% ont été ajoutés avant décongélation 10 minutes à température ambiante. Puis 500µL de LS-5% Tampon Posphate pH8, 0.1M ont été ajoutés au mélange avant incubation 1h30 à 70°C. Après addition de 500 mg de billes de verre, le mélange a été agité au FastPrep® (vitesse 6,5 m/s, 3 x 30s, 5minutes dans glace entre chaque run). Après ajout de 15mg de PolyVinylPolyPyrrolidone (PVPP) et mélange au vortex, les tubes ont été centrifugés 5 minutes à 20000g. Le surnageant a été réservé et le culot restant lavé trois fois avec 500µL de TENP. A chaque fois, le surnageant a été récupéré après centrifugation. Tous les surnageants ont été poolés et centrifugés une dernière fois pour éliminer les dernières suspensions.

L'ADN a été précipité avec 1mL d'isopropanol. Après avoir mélangé par retournements successifs et laissé reposer 10 minutes à température ambiante, le mélange a été centrifugé 10 minutes à 20000g. Le culot a été récupéré et resuspendu dans 450µL de tampon Posphate pH8 0.1M 0.1M et 50µL d'acétate de potassium 5M. Le mélange a été laissé la nuit à 4°C pour laisser précipiter les impuretés.

Après centrifugation 30 minutes (20000g, 4°C), le surnageant contenant l'ADN purifié a été récupéré. Deux microlitres de Rnase 10mg/mL ont été ajoutés puis le mélange a été incubé 30 minutes à 37°C. Après addition d'1 mL d'éthanol absolu et de 50µL d'acétate de sodium 3M, et mélange délicat par retournements successifs, les tubes ont été centrifugés (10 minutes à 20 000g). Le culot a ensuite été lavé avec 1mL d'éthanol 70% à 3 reprises puis à chaque fois centrifugé (1minute à 15000g). Après avoir séché le culot, il a été repris dans 100 µl de TE 1X avant d'être congelé à -20°C.

II.C.1.C. Séquençage et analyse statistique

Le séquençage a ensuite été effectué après amplification des gènes codant pour l'ARN 16S comme décrit précédemment[227]. Pour l'analyse du séquençage, Qiime a été utilisé pour l'alignement des séquences, l'assignation des taxons, les diversités alpha (richesse au sein d'un échantillon) et beta (variabilité inter échantillon). Le logiciel R a été utilisé pour comparer les échantillons entre eux. Les tests Anova et Mann-Whitney Wilcoxon ont été utilisés, avec une valeur $p = 0,1$. Le logiciel R a été également utilisé pour l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et la visualisation des graphes.

II.C.2. Résultats

Les analyses intermédiaires n'ont pas mis en évidence de différences en fonction du temps, peut-être du fait d'un manque de puissance. Nous avons choisi empiriquement d'étudier les modifications du microbiote après une semaine soit $J \geq 8$ en poolant J14 et J21.

Il n'y avait pas de modification de l'alpha diversité après administration de 3-oxo-C12 ou de 3-oxo-C12 :2 (figure 17).

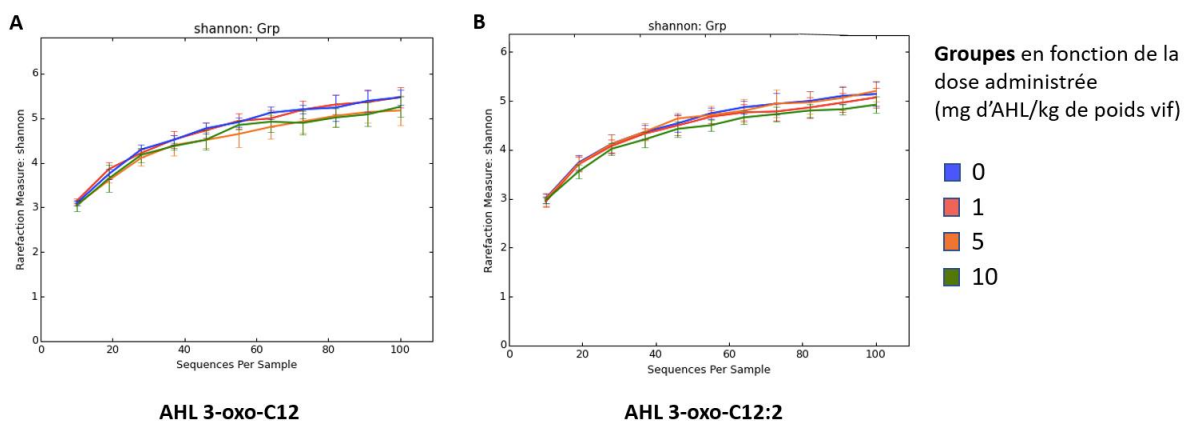


Figure 17. Alpha diversité (indice de Shannon) en fonction des groupes (0, 1, 5 ou 10 mg d'AHL/kg de poids vif) : A : administration de 3-oxo-C12, B : administration de 3-oxo-C12 :2

En revanche, si l'on regarde la composition taxonomique en fonction de l'AHL administrée et de sa concentration après J7, on observe des modifications (figure 18). La 3-oxo-C12 aux concentrations de 5 et 10 mg/kg entraîne une augmentation des Bacteroidetes aux dépens des Firmicutes (figure 18A). Au contraire, la 3-oxo-C12 :2 aux concentrations de 5 et 10 mg/kg entraîne une augmentation des Firmicutes (figure 18B). L'analyse plus précise du rapport Firmicutes/Bacteroidetes confirme ces résultats (figure 19). Notamment, l'AHL 3-oxo-C12 :2 à la concentration de 5 mg/kg augmentait significativement le rapport Firmicutes/Bacteroidetes par rapport au groupe 1 mg/kg (3,7 vs 2,4 ; $p=0,02$) et par rapport au groupe contrôle 0mg/kg (3,7 vs 2,2 ; $p= 0,03$) (figure 19B).

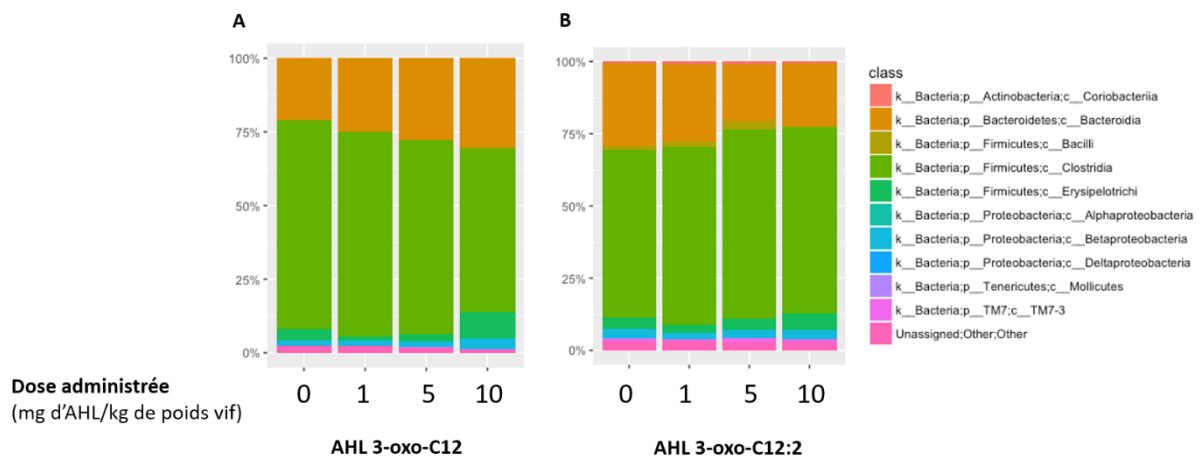


Figure 18. Composition taxonomique du microbiote de souris en fonction de l'AHL administrée et des doses.

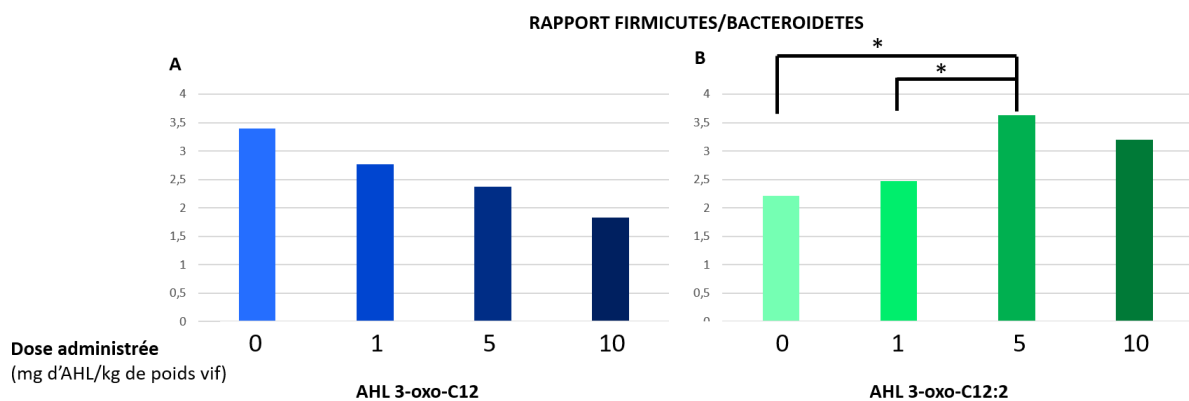


Figure 19. Rapport Firmicutes/Bacteroidetes en fonction de l'AHL administrée et des doses.

* : $p<0,05$

La 3-oxo-C12:2 administrée par voie orale était donc capable de modifier le microbiote intestinal de souris en augmentant après 1 semaine le taux de Firmicutes. Ces résultats n'étaient pas observés

avec la 3-oxo-C12 qui a plutôt tendance à diminuer le taux de Firmicutes aux dépens des Bacteroidetes.

L'ensemble de ces résultats seront discutés dans la partie « Discussion générale et perspectives » qui suit.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

Cette thèse avait pour but d'étudier l'implication d'un type de molécules du QS, les AHL, dans l'écosystème intestinal normobiotique et dans la dysbiose associée aux MICI. La première étape a été de mettre en évidence ces molécules de communication interbactérienne dans des échantillons de selles donc dans un milieu complexe, grâce à une méthode d'extraction originale et à l'utilisation de la spectrométrie de masse. C'est la première fois que les AHLs ont été identifiées dans l'écosystème intestinal humain. En utilisant une cohorte de patients bien phénotypés comparés à des sujets sains, dans le cadre d'une étude translationnelle, nous avons été plus loin en identifiant une nouvelle AHL prédominante dans l'écosystème intestinal, l'AHL 3-oxo-C12 :2. Cette AHL qui était diminuée chez les patients atteints de MICI était corrélée à un état de normobiose. La deuxième partie de ce travail de thèse a été centré sur les effets cellulaires de cette nouvelle AHL, proche de la 3-oxo-C12 de *Pseudomonas aeruginosa* qui a été largement étudiée notamment pour son effet sur les voies de l'inflammation. Cette stratégie est cohérente avec l'orientation actuelle de la recherche sur le microbiote intestinal au cours des MICI, centrée sur les conséquences fonctionnelles de la dysbiose et l'identification de métabolites bactériens ayant un rôle potentiel sur la régulation de la réponse inflammatoire de l'hôte. Dans ce cadre, nous avons exploré l'activité de la 3-oxo-C12 :2 sur des cellules épithéliales intestinales. Nous avons mis en évidence un effet de cette AHL que nous avons qualifié de « protecteur », à travers la diminution de la réponse inflammatoire sans augmentation de la perméabilité. Par ailleurs, les premières expériences *in vivo* montrent que l'administration d'AHLs est capable de modifier la composition du microbiote. En effet la 3-oxo-C12 :2 augmente le rapport Firmicutes/Bacteroidetes chez les souris.

Découverte d'AHLs dans l'écosystème intestinal par spectrométrie de masse

Après la découverte d'AHLs dans plusieurs écosystèmes et les données croissantes dans la littérature associant AI-2[216,218], une autre molécule du QS, à l'écosystème intestinal, la question de l'implication des AHLs dans cet écosystème complexe se posait d'autant plus. D'ailleurs, en 2013 Swearingen *et al* posaient clairement cette question : y-a-t-il des AHLs dans les intestins des mammifères ?[223] Dans cette revue, les auteurs émettent l'hypothèse que les AHLs sont produites dans le tractus intestinal bien qu'elles n'aient jamais été détectées jusqu'à présent. Leur conclusion est que la spectrométrie de masse, une méthode plus sensible et moins biaisée que les systèmes rapporteurs devrait être appliquée à la recherche d'AHL dans l'écosystème intestinal. C'est grâce à cette méthode que nous avons pu apporter un début de réponse. En effet, la spectrométrie de masse, en prenant en compte la structure moléculaire des AHLs, permet leur détection dans un milieu riche et complexe. Néanmoins, un travail préliminaire important a été réalisé pour adapter les

méthodes d'extraction précédemment utilisées pour la détection des AHLs dans des surnageants bactériens majoritairement, à des échantillons de selles. Les freins majeurs étaient l'adaptation à la nature solide de l'échantillon, à sa variabilité selon les sujets (sains ou MICI) et surtout à sa complexité. C'est pour ces raisons que nous avons utilisé une extraction originale en plusieurs étapes. L'étape de lyophilisation précédant l'extraction en elle-même a permis de s'affranchir au maximum de la variabilité de la consistance des selles pour uniformiser le plus possible la méthode d'extraction. Par ailleurs, nous avons rapporté la concentration d'AHLs au poids sec ce qui nous semble indispensable. En effet, sans cela, il était impossible de savoir si l'absence de détection d'AHL était due à leur faible quantité dans les selles ou à leur dilution en période de poussée. La première étape d'extraction solide-liquide utilisant un soxhlet a été déterminante pour pouvoir adapter l'extraction habituelle des surnageants bactériens par l'acétate d'éthyle à un échantillon solide de selles lyophilisées. Dans un compromis pour détecter la plus grande diversité d'AHLs, qui ont une hydrophobicité variable, sans extraire trop de molécules « polluants », nous avons exploité le caractère amphiphile des AHLs. Nous avons pour cela testé plusieurs protocoles d'extraction en comparant à la fois les concentrations de l'AHL « naturelle » prédominante (3-oxo-C12 :2) qui avait été mise en évidence dès les résultats préliminaires et les concentrations d'AHLs standards de structures chimiques variables ajoutées dans les selles avant congélation. Nous avons pu ainsi confirmer que la congélation et la lyophilisation n'altérait pas la détection des AHLs. Après avoir testé différents solvants et colonnes SPE, nous avons déterminé un protocole en examinant plusieurs critères. Le rendement d'extraction des AHLs supplémentées a bien évidemment été considéré avec attention mais le rendement d'extraction de l'AHL 3-oxo-C12 :2 a été décisif. Nous avons ainsi choisi un protocole d'extraction permettant de détecter le plus d'AHLs différentes avec le meilleur rendement global mais nous avons pris en compte également sa faisabilité et sa reproductibilité. Notre objectif était de pouvoir utiliser ce protocole en plusieurs étapes déjà contraignant à un nombre d'échantillons suffisant pour pouvoir comparer les profils d'AHL chez les patients atteints de MICI aux témoins. Malgré cela, le rendement d'extraction reste variable selon le type d'AHLs. Il est donc possible que nous soyons passés à côté d'autres AHLs dont la concentration n'a pas atteint le seuil de détection du fait d'un rendement d'extraction plus faible. Par ailleurs, la détection elle-même par spectrométrie de masse est plus sensible selon la structure chimique des AHLs, notamment la substitution et la longueur de la chaîne carbonée, qui modifie l'efficacité d'ionisation de la molécule[154,155]. Néanmoins, l'AHL 3-oxo-C12 :2 qui a été mise en évidence comme l'AHL prédominante de l'écosystème intestinal humain avec notre technique, est présente en quantité moindre chez les patients atteints de MICI. Par la suite cette AHL a été corrélée à un état de

normobiose. Ces 2 éléments mettent en exergue l'importance de la 3-oxo-C12 :2 dans le microbiote intestinal.

Place de l' AHL 3-oxo-C12 :2 dans l'écosystème intestinal humain

Cette étude exploratoire soulève de nombreuses questions pour l'instant non résolues : au sein du microbiote intestinal, qui produit la 3-oxo-C12 :2 ? Qui est capable de la reconnaître ? Est-elle capable d'influencer l'équilibre du microbiote intestinal et dans quel sens ? Nos résultats ne nous permettent pas de répondre aux 2 premières questions. En effet, l'analyse des données du microbiote et de la concentration de la 3-oxo-C12 a montré qu'il existait une corrélation entre l'AHL 3-oxo-C12 :2 et certains groupes ou espèces bactériens notamment du phylum des Firmicutes. Mais aucune corrélation n'était assez forte pour identifier un candidat bactérien ni pour la synthèse ni pour la cible de la 3-oxo-C12 :2. Par ailleurs, aucune des expériences réalisées dans le laboratoire sur des souches bactériennes commensales n'a mis en évidence la production d'AHLs. Cette stratégie cependant ne paraît pas adaptée pour identifier les bactéries commensales capables de produire des AHLs en raison de nombreux biais : l'existence de bactéries commensales non cultivables, de bactéries commensales non identifiées et enfin les différences majeures entre le milieu de culture et les conditions au sein du microbiote intestinal qui peuvent influencer le métabolisme bactérien et notamment le QS. Une étude récente a mis en évidence que différentes cellules eucaryotes épithéliales étaient capables de produire un mime d'AI-2, pour activer le quorum sensing bactérien[168]. Mais cette étude a également montré que ces cellules épithéliales n'étaient pas capables de produire une imitation d'AHL. Notre hypothèse concernant la production de l'AHL 3-oxo-C12 :2 est qu'elle serait le produit final d'une chaîne trophique impliquant différents groupes bactériens du microbiote intestinal. Un système simple de type LuxI/LuxR est peu plausible dans un écosystème aussi complexe que l'écosystème intestinal. Par ailleurs, la structure chimique de la 3-oxo-C12 :2 avec une longue chaîne et 2 insaturations est compatible avec une synthèse en plusieurs étapes.

Quant à savoir si l'AHL 3-oxo-C12 :2 est capable d'influencer l'équilibre du microbiote intestinal, nous avons pu apporter un début de réponse. En effet, cette AHL est associée à une normobiose sur les données de corrélation avec le microbiote et sa concentration est diminuée dans les selles de patients atteints de MICI, notamment en poussée, par rapport aux sujets sains. En outre, sur un modèle murin, son administration favorise les Firmicutes aux dépens des Bacteroidetes.

Identification de la 3-oxo-C12 :2 et effets *in vitro*

Pour pouvoir aller plus loin sur le rôle potentiel de cette AHL, une étape limitante a été de pouvoir l'identifier. En effet, la méthode de spectrométrie de masse utilisée pour la détection des AHLs, bien que sensible, n'avait pas la résolution nécessaire pour déterminer la masse précise de cette AHL. Nous avons donc utilisé l'HPLC pour obtenir la fraction contenant l'AHL d'intérêt afin d'obtenir sa masse précise en spectrométrie haute résolution (Orbitrap). Cela a été possible malgré une faible quantité de cette molécule et sans que les efforts pour augmenter la quantité extraite et la purifier n'aient été fructueux. Si la masse précise nous a permis d'identifier cette AHL comme la 3-oxo-C12 :2, une incertitude persiste sur la position des doubles liaisons ainsi que sur leur caractère cis ou trans. Nous avons tenté après dérivation par la méthode DMDS (dimethyl disulfure), de déterminer par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS/MS) la position des doubles liaisons sur la chaîne carbonée[228] mais la concentration de la molécule dans l'extrait restait trop faible.

Après identification de la 3-oxo-C12 :2 par spectrométrie haute résolution, cette dernière a donc été synthétisée. N'ayant jamais été détectée auparavant, le gène de synthase de cette AHL n'était pas connu et il n'était donc pas possible d'envisager une biosynthèse bactérienne. Nous avons donc collaboré avec l'équipe de chimistes qui ont pu la synthétiser. Comme la position des doubles liaisons ainsi que leur caractère cis ou trans n'ont pas été élucidés, nous avons déterminé de façon pragmatique le cas de figure le plus probable. Nous avons comparé l'effet cellulaire de la 3-oxo-C12 :2 à celui bien décrit de la 3-oxo-C12 de *Pseudomonas aeruginosa*. En prenant en considération les PON de l'hôte qui ont été inhibées, nous avons retrouvé l'effet anti-inflammatoire de la 3-oxo-C12 à des concentrations relativement faibles (5µM) sur des cellules épithéliales intestinales Caco-2. Cet effet avait été montré sur de nombreux types cellulaires mais pas sur les cellules Caco-2[182]. Par ailleurs, nous avons confirmé les constatations de Vikstrom *et al* qui ont mis en évidence que la 3-oxo-C12 augmentait la perméabilité intestinale[200]. L'AHL 3-oxo-C12 :2 exerce elle aussi un effet anti-inflammatoire. La présence des doubles liaisons ne modifient donc pas l'effet anti-inflammatoire de la 3-oxo-C12, comme cela a déjà été décrit[193] mais permettent probablement une plus grande stabilité, un accès plus facile à sa cible, ce qui expliquerait la plus grande amplitude de concentrations (10 à 50µM). En revanche, la 3-oxo-C12 :2 ne modifie pas la perméabilité intestinale. Cette donnée est cohérente avec le fait que la 3-oxo-C12 soit produite par un pathogène dont le but est l'invasion alors que la 3-oxo-C12 :2 est le produit du microbiote intestinal dont le but putatif est de protéger la barrière intestinale. Cette discordance entre l'effet anti-inflammatoire et la modification de la perméabilité pourrait être expliqué par le fait que ces effets sont médiés par 2

récepteurs différents comme cela a été déjà suggéré[229]. Il semblerait que l'effet anti-inflammatoire soit médié par *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR), un récepteur nucléaire, et l'effet sur la perméabilité par une interaction avec la membrane. Ceci ouvre un champ de recherche sur la caractérisation des récepteurs cellulaires eucaryotes de la 3-oxoC12 :2. Si AI-2 a ouvert la voie de l'étude du QS dans la relation symbiotique entre l'hôte et l'écosystème intestinal, l'effet potentiellement double de l'AHL 3-oxo-C12 :2 à la fois sur le microbiote et sur les cellules épithéliales intestinales souligne l'intérêt de la prendre en considération comme un métabolite bactérien important. Par ailleurs au cours des MICI, la diminution de la 3-oxo-C12 :2 pourrait être utilisée comme un marqueur de la dysbiose. De plus, sa diminution pourrait contribuer à activer les voies de l'inflammation et à augmenter la perméabilité. La 3-oxo-C12 :2 pourrait donc être impliquée dans la physiopathologie des MICI et plus particulièrement dans l'interaction entre microbiote et cellules épithéliales.

PERSPECTIVES

Ce travail exploratoire qui peut être considéré comme une preuve de concept ouvre de nombreuses perspectives en fonction du point de vue que l'on choisit.

Identification d'AHLs

Du point de vue moléculaire, des efforts supplémentaires pourraient évidemment être faits pour identifier d'autres AHLs dans les selles et/ou caractériser les positions des doubles liaisons de la 3-oxoC12 :2. Par exemple, on pourrait coupler des méthodes d'extractions complémentaires et des techniques de spectrométrie de masse plus sensibles et plus précises. Ou encore, pour extraire spécifiquement la 3-oxo-C12 :2, il est possible d'utiliser des résines comme la résine hydrazine, réagissant avec le groupement oxo et permettant de capturer puis de libérer les AHLs oxo[230,231]. En réussissant ainsi à obtenir une large quantité de 3-oxo-C12 :2, nous pourrions réussir à identifier après dérivation par la méthode DMDS (diméthyl disulfure), par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS/MS) la position des doubles liaisons sur la chaîne carbonée grâce à une analyse attentive des profils de fragmentation[228].

AHL 3-oxo-C12 :2 et bactéries commensales

Du point microbiologique et dans l'objectif de mieux connaître le microbiote et ses métabolites, identifier la ou les bactéries impliquées dans la synthèse de la 3-oxo-C12 :2 ainsi que celles qui la reconnaissent est essentiel. Par des techniques de bioinformatique, il est possible de rechercher les analogues de LuxI et de LuxR dans les génomes des bactéries commensales séquencés ou des bases

de données métagénomiques (MetaHIT) comme cela a été fait dans l'écosystème marin[220]. Cependant, devant le caractère doublement insaturé de la 3-oxo-C12 :2, il faudrait également rechercher des gènes de désaturases, dans l'hypothèse probable d'une synthèse en plusieurs étapes impliquant différents acteurs du microbiote. Par ailleurs, à la fois les gènes de synthèse mais surtout ceux des récepteurs comme cela a été mis en évidence avec l'identification de LuxR orphelins[176], peuvent être très différents des analogues LuxI ou LuxR déjà identifiés. De façon plus intéressante, on pourrait imaginer identifier les bactéries qui reconnaissent l'AHL 3-oxo-C12 :2 en utilisant une 3-oxo-C12 :2 fluorescente couplée à des techniques de tri cellulaire adaptées au microbiote comme l'a fait Maurice *et al*[232].

Rôle de l'AHL 3-oxo-C12 :2 sur le microbiote

Du point de vue écologique plus global et dans la continuité des premiers résultats obtenu sur la modification du microbiote chez des souris à l'état basal, il est logique de rechercher un effet dynamique de la 3-oxo-C12 :2 sur la résilience du microbiote. Par ses propriétés d'auto-induction, la 3-oxo-C12 :2 exerce une sorte d'effet « loupe » sur certaines bactéries commensales associées à la normobiose. Comme cela a été fait avec AI-2, la 3-oxo-C12 :2 pourrait être administrée chez des souris après antibiothérapie pour voir son effet sur la correction de la dysbiose[218]. Par ailleurs, pour étudier l'effet de la 3-oxo-C12 :2 de façon plus fine sur le microbiote intestinal humain, des souris à flore contrôlée ou à flore humanisée pourraient être utilisées[93]. Ainsi, les effets de la 3-oxo-C12 :2 *in vivo* seraient étudiés de façon dynamique comme nous l'avons fait avec des souris à l'état basal mais en s'intéressant successivement à différents groupes bactériens. Enfin, en retournant à la cohorte de patients atteints de MICI, nous pourrions étudier la présence d'AHLs en général et de la 3-oxo-C12 :2 en particulier sur les pièces opératoires de patients ayant une résection iléo-caecale pour une maladie de Crohn en parallèle de l'analyse du microbiote associé à la muqueuse. Une comparaison avec les biopsies de la coloscopie faite à 6 mois post-opératoire comme cela est prévu dans l'étude REMIND [233] nous donnerait une évolution de ces données chez le même patient en fonction de la récurrence endoscopique dans une situation clinique bien codifiée.

Effets *in vitro* de l'AHL 3-oxo-C12 :2

Du point de vue biologique et pour approfondir la description des effets cellulaires de l'AHL 3-oxo-C12 :2, il paraît très intéressant à la fois de préciser les partenaires cellulaires de cette AHL et de modifier les conditions expérimentales afin de rechercher d'autres effets cellulaires potentiels. En utilisant toujours une AHL modifiée (fluorescente ou couplée à la biotine), il serait possible de localiser l'AHL dans la cellule eucaryote comme nous l'avons fait avec la 3-oxo-C12-FITC et même de

tenter d'identifier son/ses récepteur(s) et partenaires cellulaires. Par ailleurs, l'AHL 3-oxo-C12 ne modifiant pas la perméabilité intercellulaire sur les cellules Caco-2 à l'état basal, des expériences sont en cours dans le laboratoire pour savoir si cette molécule serait au contraire capable d'atténuer les modifications de la perméabilité après un stimulus par cytokines pro-inflammatoires. Si c'était le cas, l'intérêt de cette AHL serait d'autant plus grand dans les MICI puisque l'altération de la perméabilité intestinale semble être un phénomène précoce dans la physiopathologie de la maladie de Crohn[67]. Comme cela a été décrit avec la 3-oxo-C12, la 3-oxo-C12 :2 pourrait avoir des effets potentiels sur d'autres types cellulaires notamment des cellules immunitaires (lymphocytes, PBMC...) et d'autres effets cellulaires comme l'induction de l'apoptose, la modification du calcium intracellulaire et l'interaction avec le stress du réticulum endoplasmique. Ce dernier effet est particulièrement intéressant depuis qu'il a été montré qu'il jouait un rôle important dans la physiopathologie de la RCH[63]. Enfin, les effets cellulaires de l'acide tétramique qui est un produit de transformation des AHLs 3-oxo pourrait également être étudiés. Par son effet chélateur du fer précédemment décrit[234,235], cette molécule potentialiserait alors l'effet anti-inflammatoire de l'AHL 3-oxo-C12 :2.

Effets *in vivo* de l'AHL 3-oxo-C12 :2

Enfin, considérant la possibilité que la 3-oxo-C12 :2 pourrait à la fois aider à restaurer la normobiose, avoir un effet anti-inflammatoire et atténuer les modifications de la perméabilité intestinale, celle-ci pourrait constituer une piste thérapeutique dans les MICI. En effet, à l'heure où les traitements disponibles interagissent de façon tardive avec les voies de l'inflammation, la recherche de traitements permettant de manipuler le microbiote et d'intervenir sur les modifications précoces au niveau épithélial est particulièrement d'actualité. Par ailleurs, après le manque d'efficacité des probiotiques au cours des MICI et le caractère 'non calibré' de la transplantation de microbiote fécal, il est particulièrement séduisant d'utiliser un métabolite bactérien comme traitement potentiel. Dans cette optique, nous projetons de tester *in vivo* l'AHL 3-oxo-C12 :2 sur un modèle de colite chimique (TNBS ou DSS) pour savoir si elle peut, dans ce cadre, accélérer la restauration d'une normobiose, diminuer les modifications inflammatoires et de la perméabilité intestinale et ainsi prévenir la colite et/ou accélérer la récupération. Les doses de 5 et 10 mg d'AHL/kg de poids vif solubilisées dans du DMSO 0,1% et administrées dans l'eau de boisson qui ont été testés à l'état basal seraient utilisées puisqu'elles sont capables de modifier la composition du microbiote. En plus de la voie d'administration orale, l'administration intrapéritonéale de cette AHL pourrait permettre de distinguer les effets médiés par la modification du microbiote des effets sur les voies de l'inflammation. L'AHL 3-oxo-C12 :2 serait comparée à l'AHL 3-oxo-C12 et au DMSO 0,1% comme

contrôle négatif. Par ailleurs, il existe des antagonistes naturels ou de synthèse des récepteurs LuxR[178]. Il peut s'agir d'une AHL modifiée qui se fixe au récepteur sans l'activer et inhibe le QS en rentrant en compétition avec l'AHL. Pour tester la spécificité de l'effet de la 3-oxo-C12 :2, nous pourrions co-administrer l'AHL et des concentrations croissantes d'une AHL modifiée antagoniste. Des critères cliniques, histologiques ainsi que la composition du microbiote et le profil d'AHL dans les selles seraient étudiés. En outre, la perméabilité intestinale pourrait être mesurée *in vivo* à l'état basal et après induction d'une colite, en présence ou non d'AHL, par la mesure du flux du Dextran FITC 4kDa dans le sérum[236]. Par ailleurs, cette AHL pourrait également être testée sur d'autres modèles murins de MICI et notamment sur le modèle double KO IL10/Nox1 conduisant au développement d'une colite RCH like et qui présente des anomalies importantes du stress du réticulum endoplasmique[64]. Une des limites des expériences *in vivo* avec la 3-oxo-C12 :2 est que nous ne prenons pas en compte l'action des PON comme nous l'avons fait en les inhibant *in vitro*. Après les possibilités de synthèse d'AHLs modifiées comme moyen de comprendre l'action cellulaire des AHLs, notre collaboration avec l'équipe de chimistes nous offre la possibilité d'utiliser des AHLs modifiées comme thérapeutique. La synthèse d'une 3-oxo-C12 :2 résistante aux PON, en changeant l'oxygène du noyau lactone, lieu de clivage des lactonases, pour un azote ou un carbone par exemple, nous affranchirait d'inhiber les PON. D'autres modifications chimiques de la 3-oxo-C12 :2 pour vectoriser l'AHL afin de l'enrober chimiquement ou de la transporter dans une bactérie probiotique pour qu'elle soit délivrée dans le colon et non modifiée par les variations de pH nous permettrait d'optimiser son mode d'administration. En effet, en plus des modifications enzymatiques par les PON, le milieu et notamment le pH basique entraîne une dégradation des AHLs. Evidemment ces AHLs modifiées seront préalablement testées pour savoir si elles conservent leur activité anti-inflammatoire.

CONCLUSION

Cette étude translationnelle exploratoire, en utilisant la spectrométrie de masse de façon ciblée, ouvre la voie de l'étude du QS impliquant les AHLs dans l'écosystème intestinal humain. Le caractère innovant a donc été de rechercher *a priori* ces petites molécules dans un milieu particulièrement complexe. Cette approche nous a conduit à identifier une nouvelle AHL 3-oxo-C12 :2 qui semble être produite par le microbiote normobiotique et qui est perdue au cours des MICI. Notre préoccupation a été d'explorer les conséquences potentielles de cette perte. De façon intéressante, nous avons mis en évidence que ce métabolite bactérien a un effet « protecteur » sur les cellules épithéliales intestinales *in vitro*. En outre, cette AHL est capable de modifier le microbiote intestinal de souris *in vivo*. Ces résultats originaux suggèrent que la 3-oxo-C12 :2 pourrait à la fois jouer un rôle dans le maintien de l'équilibre du microbiote intestinal comme molécule de communication inter espèces et dans la relation hôte-bactéries.

Tout en m'appuyant sur les compétences techniques du laboratoire en spectrométrie de masse et dans l'étude du microbiote intestinal ainsi que sur les compétences de nos collaborateurs chimistes, j'ai été personnellement investie dès les débuts de ce travail exploratoire dans le cadre de ma thèse. Poser les premières pierres de ce large sujet d'étude avec la seule conviction d'une idée cohérente sur le plan biologique et physiopathologique a demandé toute mon énergie. Mais cela m'a offert la possibilité de développer des connaissances approfondies sur le sujet et des compétences techniques variées allant de la spectrométrie de masse à la culture cellulaire en passant par l'analyse du microbiote. Malgré les difficultés rencontrées et le risque pris, notre stratégie nous a permis d'obtenir des résultats cohérents. Le caractère nouveau de ces résultats ne nous permet pas de les confronter à la littérature sur le sujet. En revanche, étant partis des patients atteints de MICI, notre objectif est de revenir vers les patients avec une nouvelle piste physiopathologique et thérapeutique. C'est pourquoi de larges efforts ont été fait dans le laboratoire pour développer ce sujet qui nous apparaît comme prometteur. Plus précisément, deux étudiantes en thèse sont investies pour l'une dans la construction de différents analogues chimiques de la 3-oxo-C12 :2 et pour l'autre dans l'étude du rôle de cette AHL sur la perméabilité intestinale.

Plusieurs questions restent évidemment non résolues après cette première étude qui fait office de preuve de concept. Mais située à la croisée des chemins entre la médecine, la chimie, la biologie cellulaire et la microbiologie, elle ouvre de nombreuses perspectives différentes en fonction du point de vue que l'on choisit. Enfin, dans la recherche de traitements écologiques au cours des MICI, cette

AHL 3-oxo-C12 :2 s'inscrit dans un nouveau concept pour contrôler l'inflammation et manipuler le microbiote intestinal.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Pariente B, Mary J-Y, Danese S, *et al.* Development of the Lémann index to assess digestive tract damage in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2015;**148**:52–63.e3. doi:10.1053/j.gastro.2014.09.015
- 2 Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers Complicating Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 2015;**372**:1441–52. doi:10.1056/NEJMra1403718
- 3 Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2017;**152**:313–321.e2. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.020
- 4 Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, *et al.* Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;**140**:1785–94. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.055
- 5 Manichanh C, Borruel N, Casellas F, *et al.* The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;**9**:599–608. doi:10.1038/nrgastro.2012.152
- 6 Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* 2017;**152**:327–339.e4. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.012
- 7 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:16731–16736.
- 8 Rajca S, Grondin V, Louis E, *et al.* Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;**20**:978–86. doi:10.1097/MIB.0000000000000036
- 9 Duboc H, Rajca S, Rainteau D, *et al.* Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013;**62**:531–9. doi:10.1136/gutjnl-2012-302578
- 10 Quévrain E, Maubert MA, Michon C, *et al.* Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 2016;**65**:415–25. doi:10.1136/gutjnl-2014-307649
- 11 Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol* 2016;**14**:e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533
- 12 Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 2005;**308**:1635–8. doi:10.1126/science.1110591
- 13 Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, *et al.* Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;**52**:237–242.

- 14 Fallani M, Young D, Scott J, *et al.* Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;**51**:77–84. doi:10.1097/MPG.0b013e3181d1b11e
- 15 Tyler AD, Smith MI, Silverberg MS. Analyzing the human microbiome: a “how to” guide for physicians. *Am J Gastroenterol* 2014;**109**:983–93. doi:10.1038/ajg.2014.73
- 16 Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, *et al.* Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol* 2011;**12**:R50. doi:10.1186/gb-2011-12-5-r50
- 17 Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci* 2011;**108**:4554–61. doi:10.1073/pnas.1000087107
- 18 Nielsen HB, Almeida M, Juncker AS, *et al.* Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat Biotechnol* 2014;**32**:822–8. doi:10.1038/nbt.2939
- 19 Qin J, Li R, Raes J, *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;**464**:59–65. doi:10.1038/nature08821
- 20 Hooper L. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol* 2004;**12**:129–34. doi:10.1016/j.tim.2004.01.001
- 21 Macpherson AJ, Harris NL. Opinion: Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;**4**:478.
- 22 Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, *et al.* The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009;**31**:677–89. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.020
- 23 Atarashi K, Tanoue T, Shima T, *et al.* Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science* 2011;**331**:337–41. doi:10.1126/science.1198469
- 24 Smith PM, Howitt MR, Panikov N, *et al.* The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science* 2013;**341**:569–73. doi:10.1126/science.1241165
- 25 Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, *et al.* The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002;**217**:133–9.
- 26 Christl SU, Murgatroyd PR, Gibson GR, *et al.* Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology* 1992;**102**:1269–77.
- 27 Lichtenstein AH. Intestinal cholesterol metabolism. *Ann Med* 1990;**22**:49–52. doi:10.3109/07853899009147241
- 28 Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006;**47**:241–59. doi:10.1194/jlr.R500013-JLR200
- 29 Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;**444**:1027–131. doi:10.1038/nature05414

- 30 Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, *et al.* Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;**307**:1915–20. doi:10.1126/science.1104816
- 31 Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, *et al.* Towards the Human Colorectal Cancer Microbiome. *PLoS ONE* 2011;**6**:e20447. doi:10.1371/journal.pone.0020447
- 32 Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, *et al.* Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006;**313**:848–51. doi:10.1126/science.1127059
- 33 Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, *et al.* Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012;**338**:120–3. doi:10.1126/science.1224820
- 34 Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, *et al.* Low Relative Abundances of the Mucolytic Bacterium Akkermansia muciniphila and Bifidobacterium spp. in Feces of Children with Autism. *Appl Environ Microbiol* 2011;**77**:6718–21. doi:10.1128/AEM.05212-11
- 35 Williams BL, Hornig M, Parekh T, *et al.* Application of Novel PCR-Based Methods for Detection, Quantitation, and Phylogenetic Characterization of Sutterella Species in Intestinal Biopsy Samples from Children with Autism and Gastrointestinal Disturbances. *mBio* 2012;**3**:e00261-11-e00261-11. doi:10.1128/mBio.00261-11
- 36 Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, *et al.* Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell* 2013;**155**:1451–63. doi:10.1016/j.cell.2013.11.024
- 37 Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, *et al.* Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* 2012;**142**:46–54.e42. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001
- 38 Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, *et al.* The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;**55**:749–53. doi:10.1136/gut.2005.082909
- 39 Fumery M, Singh S, Dulai PS, *et al.* Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol* Published Online First: June 2017. doi:10.1016/j.cgh.2017.06.016
- 40 Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, *et al.* Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994;**107**:3–11.
- 41 Schwartz DA, Pemberton JH, Sandborn WJ. Diagnosis and treatment of perianal fistulas in Crohn disease. *Ann Intern Med* 2001;**135**:906–18.
- 42 Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, *et al.* Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol* 1995;**30**:699–706.
- 43 Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, *et al.* The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: A population-based study. *Gastroenterology* 2001;**121**:255–60. doi:10.1053/gast.2001.26279
- 44 Laharie D, Bourreille A, Branche J, *et al.* Ciclosporin versus infliximab in patients with severe ulcerative colitis refractory to intravenous steroids: a parallel, open-label randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2012;**380**:1909–15. doi:10.1016/S0140-6736(12)61084-8

- 45 Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, *et al.* Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;**140**:1785–94. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.055
- 46 Olaison G, Smedh K, Sjö Dahl R. Natural course of Crohn's disease after ileocolic resection: endoscopically visualised ileal ulcers preceding symptoms. *Gut* 1992;**33**:331–5.
- 47 D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, *et al.* Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998;**114**:262–7.
- 48 Canavan C, Abrams KR, Mayberry JF. Meta-analysis: mortality in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;**25**:861–70. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03276.x
- 49 Treton X, Bouhnik Y, Mary J, *et al.* Azathioprine Withdrawal in Patients With Crohn's Disease Maintained on Prolonged Remission: A High Risk of Relapse. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;**7**:80–5. doi:10.1016/j.cgh.2008.08.028
- 50 Sokol H, Seksik P, Cosnes J. Complications and surgery in the inflammatory bowel diseases biological era: *Curr Opin Gastroenterol* 2014;**30**:378–84. doi:10.1097/MOG.000000000000078
- 51 Orholm M, Binder V, Sørensen TI, *et al.* Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;**35**:1075–81.
- 52 Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, *et al.* Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003;**124**:1767–73.
- 53 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;**411**:599–603. doi:10.1038/35079107
- 54 Colombel J-F. Decade in review-IBD: IBD-genes, bacteria and new therapeutic strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;**11**:652–4. doi:10.1038/nrgastro.2014.170
- 55 Graham DB, Xavier RJ. From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights. *Trends Immunol* 2013;**34**:371–8. doi:10.1016/j.it.2013.04.001
- 56 Benchimol EI, Mack DR, Guttman A, *et al.* Inflammatory bowel disease in immigrants to Canada and their children: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2015;**110**:553–63. doi:10.1038/ajg.2015.52
- 57 Bastida G, Beltrán B. Ulcerative colitis in smokers, non-smokers and ex-smokers. *World J Gastroenterol* 2011;**17**:2740–7. doi:10.3748/wjg.v17.i22.2740
- 58 Odes HS, Fich A, Reif S, *et al.* Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2001;**46**:1717–21.
- 59 Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, *et al.* Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 2001;**120**:1093–9. doi:10.1053/gast.2001.23231
- 60 Andersson RE, Olaison G, Tysk C, *et al.* Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001;**344**:808–14. doi:10.1056/NEJM200103153441104

- 61 Russel MG, Dorant E, Brummer RJ, *et al.* Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group. *Gastroenterology* 1997;**113**:377–82.
- 62 Okamoto R, Watanabe M. Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2016;**51**:11–21. doi:10.1007/s00535-015-1098-4
- 63 Tréton X, Pédruzzi E, Cazals-Hatem D, *et al.* Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;**141**:1024–35. doi:10.1053/j.gastro.2011.05.033
- 64 Tréton X, Pedrucci E, Guichard C, *et al.* Combined NADPH Oxidase 1 and Interleukin 10 Deficiency Induces Chronic Endoplasmic Reticulum Stress and Causes Ulcerative Colitis-Like Disease in Mice. *PLoS ONE* 2014;**9**:e101669. doi:10.1371/journal.pone.0101669
- 65 Antoni L. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014;**20**:1165. doi:10.3748/wjg.v20.i5.1165
- 66 Quigley EMM. Leaky gut - concept or clinical entity? *Curr Opin Gastroenterol* 2016;**32**:74–9. doi:10.1097/MOG.0000000000000243
- 67 Teshima CW, Goodman KJ, El-Kalla M, *et al.* Increased Intestinal Permeability in Relatives of Patients With Crohn's Disease Is Not Associated With Small Bowel Ulcerations. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* Published Online First: 7 March 2017. doi:10.1016/j.cgh.2017.02.028
- 68 Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, *et al.* Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* Published Online First: 2 October 2013. doi:10.1038/nature12599
- 69 Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, *et al.* Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* 2011;**60**:1580–8. doi:10.1136/gut.2009.206466
- 70 Deuring JJ, Fuhler GM, Konstantinov SR, *et al.* Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn's disease. *Gut* 2014;**63**:1081–91. doi:10.1136/gutjnl-2012-303527
- 71 Parkes M. Evidence from genetics for a role of autophagy and innate immunity in IBD pathogenesis. *Dig Dis Basel Switz* 2012;**30**:330–3. doi:10.1159/000338119
- 72 Nguyen HTT, Lapaquette P, Bringer M-A, *et al.* Autophagy and Crohn's disease. *J Innate Immun* 2013;**5**:434–43. doi:10.1159/000345129
- 73 Cătană C-S, Neagoe IB, Cozma V, *et al.* Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015;**21**:5823–30. doi:10.3748/wjg.v21.i19.5823
- 74 Eksteen B. Targeting of gut specific leucocyte recruitment in IBD by vedolizumab. *Gut* 2015;**64**:8–10. doi:10.1136/gutjnl-2014-307397
- 75 Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, *et al.* Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;**109**:1344–67.
- 76 Harper PH, Lee EC, Kettlewell MG, *et al.* Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut* 1985;**26**:279–284.

- 77 Llopis M. Mucosal colonisation with *Lactobacillus casei* mitigates barrier injury induced by exposure to trinitrobenzene sulphonic acid. *Gut* 2005;**54**:955–9. doi:10.1136/gut.2004.056101
- 78 Garrett WS, Lord GM, Punit S, *et al.* Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 2007;**131**:33–45. doi:10.1016/j.cell.2007.08.017
- 79 Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;**474**:307–17. doi:10.1038/nature10209
- 80 Aleksandrova K, Romero-Mosquera B, Hernandez V. Diet, Gut Microbiome and Epigenetics: Emerging Links with Inflammatory Bowel Diseases and Prospects for Management and Prevention. *Nutrients* 2017;**9**:962. doi:10.3390/nu9090962
- 81 Biedermann L, Zeitz J, Mwinyi J, *et al.* Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. *PLoS ONE* 2013;**8**:e59260. doi:10.1371/journal.pone.0059260
- 82 Lepage P, Häsler R, Spehlmann ME, *et al.* Twin Study Indicates Loss of Interaction Between Microbiota and Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2011;**141**:227–36. doi:10.1053/j.gastro.2011.04.011
- 83 Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, *et al.* Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease: *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:653–60. doi:10.1002/ibd.20783
- 84 Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, *et al.* A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease Phenotypes. *Gastroenterology* 2010;**139**:1844–1854.e1. doi:10.1053/j.gastro.2010.08.049
- 85 Seksik P. Gut microbiota and IBD. *Gastroenterol Clin Biol* 2010;**34**:S44–S51.
- 86 Manichanh C. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;**55**:205–11. doi:10.1136/gut.2005.073817
- 87 Pascal V, Pozuelo M, Borruel N, *et al.* A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 2017;**66**:813–22. doi:10.1136/gutjnl-2016-313235
- 88 Sokol H, Seksik P, Furet JP, *et al.* Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota: *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:1183–9. doi:10.1002/ibd.20903
- 89 Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;**127**:412–21.
- 90 Hulten K, El-Zimaity HM, Karttunen TJ, *et al.* Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. *Am J Gastroenterol* 2001;**96**:1529–35. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03751.x
- 91 Naser SA, Ghobrial G, Romero C, *et al.* Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet Lond Engl* 2004;**364**:1039–44. doi:10.1016/S0140-6736(04)17058-X

- 92 Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, *et al.* The Treatment-Naive Microbiome in New-Onset Crohn's Disease. *Cell Host Microbe* 2014;**15**:382–92. doi:10.1016/j.chom.2014.02.005
- 93 Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 2013;**500**:232–6. doi:10.1038/nature12331
- 94 Sarrabayrouse G, Alameddine J, Altare F, *et al.* Microbiota-Specific CD4CD8 $\alpha\alpha$ Tregs: Role in Intestinal Immune Homeostasis and Implications for IBD. *Front Immunol* 2015;**6**. doi:10.3389/fimmu.2015.00522
- 95 Round JL, Lee SM, Li J, *et al.* The Toll-Like Receptor 2 Pathway Establishes Colonization by a Commensal of the Human Microbiota. *Science* 2011;**332**:974–7. doi:10.1126/science.1206095
- 96 Eun CS, Mishima Y, Wohlgemuth S, *et al.* Induction of Bacterial Antigen-Specific Colitis by a Simplified Human Microbiota Consortium in Gnotobiotic Interleukin-10-/- Mice. *Infect Immun* 2014;**82**:2239–46. doi:10.1128/IAI.01513-13
- 97 Nguyen HTT, Dalmaso G, Müller S, *et al.* Crohn's disease-associated adherent invasive Escherichia coli modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* 2014;**146**:508–19. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.021
- 98 Quévrain E, Maubert M-A, Sokol H, *et al.* The presence of the anti-inflammatory protein MAM, from Faecalibacterium prausnitzii, in the intestinal ecosystem. *Gut* 2016;**65**:882. doi:10.1136/gutjnl-2015-311094
- 99 van Nood E, Dijkgraaf MGW, Keller JJ. Duodenal infusion of feces for recurrent Clostridium difficile. *N Engl J Med* 2013;**368**:2145. doi:10.1056/NEJMc1303919
- 100 Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, *et al.* Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 2017;**389**:1218–28. doi:10.1016/S0140-6736(17)30182-4
- 101 Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, *et al.* Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 2015;**149**:102–109.e6. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.001
- 102 Pigneur B, Sokol H. Fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease: the quest for the holy grail. *Mucosal Immunol* 2016;**9**:1360–5. doi:10.1038/mi.2016.67
- 103 Rossen NG. Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: A systematic review. *World J Gastroenterol* 2015;**21**:5359. doi:10.3748/wjg.v21.i17.5359
- 104 Sokol H. Probiotics and antibiotics in IBD. *Dig Dis Basel Switz* 2014;**32 Suppl 1**:10–7. doi:10.1159/000367820
- 105 Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, *et al.* Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet Lond Engl* 1999;**354**:635–9.
- 106 Mimura T, Rizzello F, Helwig U, *et al.* Once daily high dose probiotic therapy (VSL# 3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004;**53**:108–114.

- 107 Neelson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 1970;**104**:313–22.
- 108 Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, *et al.* Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry (Mosc)* 1981;**20**:2444–9.
- 109 Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994;**176**:269–75.
- 110 Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 2001;**35**:439–68. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090913
- 111 Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001;**55**:165–99. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.165
- 112 Williams P, Winzer K, Chan WC, *et al.* Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2007;**362**:1119–34. doi:10.1098/rstb.2007.2039
- 113 Boyer M, Wisniewski-Dyé F. Cell–cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum: Cell–cell signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;**70**:1–19. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00745.x
- 114 Han S, Li D, Trost E, *et al.* Systemic Responses of Barley to the 3-hydroxy-decanoyl-homoserine Lactone Producing Plant Beneficial Endophyte *Acidovorax radidis* N35. *Front Plant Sci* 2016;**7**:1868. doi:10.3389/fpls.2016.01868
- 115 Swift S, Karlyshev AV, Fish L, *et al.* Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *J Bacteriol* 1997;**179**:5271–81.
- 116 Swift S, Lynch MJ, Fish L, *et al.* Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 1999;**67**:5192–9.
- 117 Zhang L, Murphy PJ, Kerr A, *et al.* *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* 1993;**362**:446–8. doi:10.1038/362446a0
- 118 Lewenza S, Conway B, Greenberg EP, *et al.* Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* 1999;**181**:748–56.
- 119 Ulrich RL, Deshazer D, Brueggemann EE, *et al.* Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *J Med Microbiol* 2004;**53**:1053–64. doi:10.1099/jmm.0.45661-0
- 120 Ulrich RL, Deshazer D, Hines HB, *et al.* Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect Immun* 2004;**72**:6589–96. doi:10.1128/IAI.72.11.6589-6596.2004
- 121 Conway B-A, Greenberg EP. Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia vietnamiensis*. *J Bacteriol* 2002;**184**:1187–91.

- 122 McClean KH, Winson MK, Fish L, *et al.* Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol Read Engl* 1997;**143 (Pt 12)**:3703–11. doi:10.1099/00221287-143-12-3703
- 123 Tan K-H, How K-Y, Tan J-Y, *et al.* Cloning and Characterization of the Autoinducer Synthase Gene from Lipid-Degrading Bacterium *Cedecea neteri*. *Front Microbiol* 2017;**8**:72. doi:10.3389/fmicb.2017.00072
- 124 McGowan S, Sebahia M, Jones S, *et al.* Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Microbiol Read Engl* 1995;**141 (Pt 3)**:541–50. doi:10.1099/13500872-141-3-541
- 125 Reverchon S, Bouillant ML, Salmond G, *et al.* Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* 1998;**29**:1407–18.
- 126 Mellbye BL, Bottomley PJ, Sayavedra-Soto LA. Nitrite-Oxidizing Bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Produces N-Acyl-Homoserine Lactone Autoinducers. *Appl Environ Microbiol* 2015;**81**:5917–26. doi:10.1128/AEM.01103-15
- 127 Lim Y-L, Ee R, How K-Y, *et al.* Complete genome sequencing of *Pandoraea pnomenusa* RB38 and Molecular Characterization of Its N-acyl homoserine lactone synthase gene ppnl. *PeerJ* 2015;**3**:e1225. doi:10.7717/peerj.1225
- 128 Beck von Bodman S, Farrand SK. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *J Bacteriol* 1995;**177**:5000–8.
- 129 Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 1997;**179**:5756–67.
- 130 Pierson LS, Keppenne VD, Wood DW. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* 1994;**176**:3966–74.
- 131 Mattiuzzo M, Bertani I, Ferluga S, *et al.* The plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* contains two conserved quorum sensing systems involved in virulence and negatively regulated by RsaL and the novel regulator RsaM. *Environ Microbiol* 2011;**13**:145–62. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02316.x
- 132 Steidle A, Allesen-Holm M, Riedel K, *et al.* Identification and characterization of an N-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**:6371–82.
- 133 Flavier AB, Ganova-Raeva LM, Schell MA, *et al.* Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* 1997;**179**:7089–97.
- 134 Rosemeyer V, Michiels J, Verreth C, *et al.* luxI- and luxR-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J Bacteriol* 1998;**180**:815–21.

- 135 Wilkinson A, Danino V, Wisniewski-Dyé F, *et al.* N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J Bacteriol* 2002;**184**:4510–9.
- 136 Wisniewski-Dyé F, Jones J, Chhabra SR, *et al.* railR genes are part of a quorum-sensing network controlled by cinI and cinR in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 2002;**184**:1597–606.
- 137 Danino VE, Wilkinson A, Edwards A, *et al.* Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* 2003;**50**:511–25.
- 138 Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, *et al.* A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 1997;**179**:7530–7.
- 139 Eberl L, Winson MK, Sternberg C, *et al.* Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* 1996;**20**:127–36.
- 140 Horng Y-T, Deng S-C, Daykin M, *et al.* The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* 2002;**45**:1655–71.
- 141 Gao M, Chen H, Eberhard A, *et al.* sinI- and expR-dependent quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 2005;**187**:7931–44. doi:10.1128/JB.187.23.7931-7944.2005
- 142 Teplitski M, Eberhard A, Gronquist MR, *et al.* Chemical identification of N -acyl homoserine lactone quorum-sensing signals produced by *Sinorhizobium meliloti* strains in defined medium. *Arch Microbiol* 2003;**180**:494–7. doi:10.1007/s00203-003-0612-x
- 143 Marketon MM, Gronquist MR, Eberhard A, *et al.* Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* 2002;**184**:5686–95.
- 144 Milton DL, Hardman A, Camara M, *et al.* Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the vanI/vanR locus and identification of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J Bacteriol* 1997;**179**:3004–12.
- 145 Engebrecht J, Nealson K, Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 1983;**32**:773–81.
- 146 Throup JP, Camara M, Briggs GS, *et al.* Characterisation of the yenI/yenR locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* 1995;**17**:345–56.
- 147 Kirwan JP, Gould TA, Schweizer HP, *et al.* Quorum-sensing signal synthesis by the *Yersinia pestis* acyl-homoserine lactone synthase Yspl. *J Bacteriol* 2006;**188**:784–8. doi:10.1128/JB.188.2.784-788.2006
- 148 Atkinson S, Throup JP, Stewart GS, *et al.* A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol* 1999;**33**:1267–77.

- 149 Steindler L, Venturi V. Detection of quorum-sensing N -acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* 2007;**266**:1–9. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00501.x
- 150 Frommberger M, Schmitt-Kopplin P, Ping G, *et al.* A simple and robust set-up for on-column sample preconcentration--nano-liquid chromatography--electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of N-acylhomoserine lactones. *Anal Bioanal Chem* 2004;**378**:1014–20. doi:10.1007/s00216-003-2400-5
- 151 Cataldi TRI, Bianco G, Frommberger M, *et al.* Direct analysis of selected N-acyl-L-homoserine lactones by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;**18**:1341–4. doi:10.1002/rcm.1480
- 152 Cataldi TRI, Bianco G, Fonseca J, *et al.* Perceiving the chemical language of Gram-negative bacteria: listening by high-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2013;**405**:493–507. doi:10.1007/s00216-012-6371-2
- 153 Morin D, Grasland B, Vallee-Rehel K, *et al.* On-line high-performance liquid chromatography–mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J Chromatogr A* 2003;**1002**:79–92.
- 154 Cataldi TRI, Bianco G, Abate S. Profiling of N-acyl-homoserine lactones by liquid chromatography coupled with electrospray ionization and a hybrid quadrupole linear ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR-MS). *J Mass Spectrom* 2007;**43**:82–96. doi:10.1002/jms.1275
- 155 Ortori CA, Atkinson S, Chhabra SR, *et al.* Comprehensive profiling of N-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole–linear ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007;**387**:497–511. doi:10.1007/s00216-006-0710-0
- 156 Ortori CA, Dubern J-F, Chhabra SR, *et al.* Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-l-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2011;**399**:839–50. doi:10.1007/s00216-010-4341-0
- 157 Li X, Fekete A, Englmann M, *et al.* Development and application of a method for the analysis of N-acylhomoserine lactones by solid-phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2006;**1134**:186–93. doi:10.1016/j.chroma.2006.09.047
- 158 Cataldi TRI, Bianco G, Abate S. Accurate mass analysis of N-acyl-homoserine-lactones and cognate lactone-opened compounds in bacterial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by LC-ESI-LTQ-FTICR-MS. *J Mass Spectrom* 2009;**44**:182–92. doi:10.1002/jms.1479
- 159 Cataldi TRI, Bianco G, Abate S, *et al.* Identification of unsaturated N-acylhomoserine lactones in bacterial isolates of *Rhodobacter sphaeroides* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Unsaturated AHLs produced by *Rhodobacter sphaeroides*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;**25**:1817–26. doi:10.1002/rcm.5054
- 160 Sturme MH, Kleerebezem M, Nakayama J, *et al.* Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;**81**:233–243.

- 161 Lyon GJ, Novick RP. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* 2004;**25**:1389–403. doi:10.1016/j.peptides.2003.11.026
- 162 Greenberg EP, Hastings JW, Ulitzur S. Induction of luciferase synthesis in *Beneckeia harveyi* by other marine bacteria. *Arch Microbiol* 1979;**120**:87–91. doi:10.1007/BF00409093
- 163 Bassler BL, Wright M, Showalter RE, *et al.* Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* 1993;**9**:773–86.
- 164 Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2013;**37**:156–81. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00345.x
- 165 Federle MJ. Autoinducer-2-Based Chemical Communication in Bacteria: Complexities of Interspecies Signaling. In: Collin M, Schuch R, eds. *Contributions to Microbiology*. Basel: : KARGER 2009. 18–32. doi:10.1159/000219371
- 166 Bassler BL, Losick R. Bacterially Speaking. *Cell* 2006;**125**:237–46. doi:10.1016/j.cell.2006.04.001
- 167 Xavier KB, Bassler BL. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature* 2005;**437**:750–3. doi:10.1038/nature03960
- 168 Ismail AS, Valastyan JS, Bassler BL. A Host-Produced Autoinducer-2 Mimic Activates Bacterial Quorum Sensing. *Cell Host Microbe* 2016;**19**:470–80. doi:10.1016/j.chom.2016.02.020
- 169 Hawver LA, Jung SA, Ng W-L. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiol Rev* 2016;**40**:738–52. doi:10.1093/femsre/fuw014
- 170 Utari PD, Vogel J, Quax WJ. Deciphering Physiological Functions of AHL Quorum Quenching Acylases. *Front Microbiol* 2017;**8**. doi:10.3389/fmicb.2017.01123
- 171 Dong Y-H, Gusti AR, Zhang Q, *et al.* Identification of Quorum-Quenching N-Acyl Homoserine Lactonases from *Bacillus* Species. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**:1754–9. doi:10.1128/AEM.68.4.1754-1759.2002
- 172 Lowery CA, Park J, Gloeckner C, *et al.* Defining the Mode of Action of Tetramic Acid Antibacterials Derived from *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Signals. *J Am Chem Soc* 2009;**131**:14473–9. doi:10.1021/ja9056079
- 173 Romero M, Martin-Cuadrado A-B, Roca-Rivada A, *et al.* Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities: Quorum quenching in marine bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 2011;**75**:205–17. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01011.x
- 174 Eberl L, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int J Med Microbiol IJMM* 2004;**294**:123–31. doi:10.1016/j.ijmm.2004.06.022
- 175 Papenfort K, Bassler B. Quorum-Sensing Signal-Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2016;**14**:576–88. doi:10.1038/nrmicro.2016.89
- 176 Hudaiberdiev S, Choudhary KS, Vera Alvarez R, *et al.* Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;**5**. doi:10.3389/fcimb.2015.00020

- 177 Soares JA, Ahmer BM. Detection of acyl-homoserine lactones by Escherichia and Salmonella. *Curr Opin Microbiol* 2011;**14**:188–93. doi:10.1016/j.mib.2011.01.006
- 178 Grandclément C, Tannières M, Moréra S, *et al.* Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* 2016;**40**:86–116. doi:10.1093/femsre/fuv038
- 179 Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, *et al.* Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005;**46**:1239–47. doi:10.1194/jlr.M400511-JLR200
- 180 Bar-Rogovsky H, Hugenmatter A, Tawfik DS. The Evolutionary Origins of Detoxifying Enzymes: THE MAMMALIAN SERUM PARAOXONASES (PONs) RELATE TO BACTERIAL HOMOSERINE LACTONASES. *J Biol Chem* 2013;**288**:23914–27. doi:10.1074/jbc.M112.427922
- 181 Devarajan A, Bourquard N, Grijalva VR, *et al.* Role of PON2 in innate immune response in an acute infection model. *Mol Genet Metab* 2013;**110**:362–70. doi:10.1016/j.ymgme.2013.07.003
- 182 Teplitski M, Mathesius U, Rumbaugh KP. Perception and degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals by mammalian and plant cells. *Chem Rev* 2011;**111**:100–16. doi:10.1021/cr100045m
- 183 DiMango E, Zar HJ, Bryan R, *et al.* Diverse Pseudomonas aeruginosa gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 1995;**96**:2204.
- 184 Williams SC, Patterson EK, Carty NL, *et al.* Pseudomonas aeruginosa Autoinducer Enters and Functions in Mammalian Cells. *J Bacteriol* 2004;**186**:2281–7. doi:10.1128/JB.186.8.2281-2287.2004
- 185 Ritchie AJ, Whittall C, Lazenby JJ, *et al.* The immunomodulatory Pseudomonas aeruginosa signalling molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone enters mammalian cells in an unregulated fashion. *Immunol Cell Biol* 2007;**85**:596.
- 186 Bryan A, Watters C, Koenig L, *et al.* Human transcriptome analysis reveals a potential role for active transport in the metabolism of Pseudomonas aeruginosa autoinducers. *Microbes Infect* 2010;**12**:1042–50. doi:10.1016/j.micinf.2010.07.006
- 187 Davis BM, Jensen R, Williams P, *et al.* The Interaction of N-Acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Signaling Molecules with Biological Membranes: Implications for Inter-Kingdom Signaling. *PLoS ONE* 2010;**5**:e13522. doi:10.1371/journal.pone.0013522
- 188 Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, *et al.* IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the Pseudomonas autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF- κ B and activator protein-2. *J Immunol* 2001;**167**:366–374.
- 189 Jahoor A, Patel R, Bryan A, *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Mediate Host Cell Proinflammatory Responses to Pseudomonas aeruginosa Autoinducer. *J Bacteriol* 2008;**190**:4408–15. doi:10.1128/JB.01444-07
- 190 Shiner EK, Terentyev D, Bryan A, *et al.* Pseudomonas aeruginosa autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling. *Cell Microbiol* 2006;**8**:1601–10. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00734.x

- 191 Vikström E, Magnusson K-E, Pivoriūnas A. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone stimulates phagocytic activity in human macrophages through the p38 MAPK pathway. *Microbes Infect* 2005;**7**:1512–8. doi:10.1016/j.micinf.2005.05.012
- 192 Telford G, Wheeler D, Williams P, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone Has Immunomodulatory Activity. *Infect Immun* 1998;**66**:36–42.
- 193 Chhabra SR, Harty C, Hooi DSW, *et al.* Synthetic Analogues of the Bacterial Signal (Quorum Sensing) Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine Lactone as Immune Modulators. *J Med Chem* 2003;**46**:97–104. doi:10.1021/jm020909n
- 194 Ritchie AJ, Yam AOW, Tanabe KM, *et al.* Modification of In Vivo and In Vitro T- and B-Cell-Mediated Immune Responses by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Infect Immun* 2003;**71**:4421–31. doi:10.1128/IAI.71.8.4421-4431.2003
- 195 Ritchie AJ, Jansson A, Stallberg J, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule N-3-(Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone Inhibits T-Cell Differentiation and Cytokine Production by a Mechanism Involving an Early Step in T-Cell Activation. *Infect Immun* 2005;**73**:1648–55. doi:10.1128/IAI.73.3.1648-1655.2005
- 196 Kravchenko VV, Kaufmann GF, Mathison JC, *et al.* Modulation of Gene Expression via Disruption of NF- κ B Signaling by a Bacterial Small Molecule. *Science* 2008;**321**:259–63. doi:10.1126/science.1156499
- 197 Khambati I, Han S, Pijnenburg D, *et al.* The bacterial quorum-sensing molecule, N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone, inhibits mediator release and chemotaxis of murine mast cells. *Inflamm Res* 2017;**66**:259–68. doi:10.1007/s00011-016-1013-3
- 198 Glucksam-Galnoy Y, Sananes R, Silberstein N, *et al.* The Bacterial Quorum-Sensing Signal Molecule N-3-Oxo-Dodecanoyl-L-Homoserine Lactone Reciprocally Modulates Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Activated Macrophages. *J Immunol* 2013;**191**:337–44. doi:10.4049/jimmunol.1300368
- 199 Cooley MA, Whittall C, Rolph MS. *Pseudomonas* signal molecule 3-oxo-C12-homoserine lactone interferes with binding of rosiglitazone to human PPAR γ . *Microbes Infect* 2010;**12**:231–7. doi:10.1016/j.micinf.2009.12.009
- 200 Vikström E, Tafazoli F, Magnusson K-E. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS Lett* 2006;**580**:6921–8. doi:10.1016/j.febslet.2006.11.057
- 201 Vikström E, Bui L, Konradsson P, *et al.* The junctional integrity of epithelial cells is modulated by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms. *Exp Cell Res* 2009;**315**:313–26. doi:10.1016/j.yexcr.2008.10.044
- 202 Vikström E, Bui L, Konradsson P, *et al.* Role of calcium signalling and phosphorylations in disruption of the epithelial junctions by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule. *Eur J Cell Biol* 2010;**89**:584–97. doi:10.1016/j.ejcb.2010.03.002

- 203 Eum SY, Jaraki D, Bertrand L, *et al.* Disruption of epithelial barrier by quorum-sensing N-3-(oxododecanoyl)-homoserine lactone is mediated by matrix metalloproteinases. *AJP Gastrointest Liver Physiol* 2014;**306**:G992–1001. doi:10.1152/ajpgi.00016.2014
- 204 Karlsson T, Turkina MV, Yakymenko O, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* N-Acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Molecules Target IQGAP1 and Modulate Epithelial Cell Migration. *PLoS Pathog* 2012;**8**:e1002953. doi:10.1371/journal.ppat.1002953
- 205 Holm A, Vikström E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front Plant Sci* 2014;**5**. doi:10.3389/fpls.2014.00309
- 206 Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* Autoinducer N-3-Oxododecanoyl Homoserine Lactone Accelerates Apoptosis in Macrophages and Neutrophils. *Infect Immun* 2003;**71**:5785–93. doi:10.1128/IAI.71.10.5785-5793.2003
- 207 Jacobi CA, Schiffner F, Henkel M, *et al.* Effects of bacterial N-acyl homoserine lactones on human Jurkat T lymphocytes-OddHL induces apoptosis via the mitochondrial pathway. *Int J Med Microbiol* 2009;**299**:509–19. doi:10.1016/j.ijmm.2009.03.005
- 208 Kravchenko VV, Kaufmann GF, Mathison JC, *et al.* N-3-Oxo-acyl)homoserine Lactones Signal Cell Activation through a Mechanism distinct from the Canonical Pathogen-associated Molecular Pattern Recognition Receptor Pathways. *J Biol Chem* 2006;**281**:28822–30. doi:10.1074/jbc.M606613200
- 209 Schwarzer C, Fu Z, Shuai S, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Homoserine Lactone Triggers Apoptosis and Bak/Bax-Independent Release of Mitochondrial Cytochrome C in Fibroblasts¹. *Cell Microbiol* 2014;**16**:1094–104. doi:10.1111/cmi.12263
- 210 Zimmermann S, Wagner C, Müller W, *et al.* Induction of Neutrophil Chemotaxis by the Quorum-Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Infect Immun* 2006;**74**:5687–92. doi:10.1128/IAI.01940-05
- 211 Lu Q, Lin Y, Yang X, *et al.* Regulation on Expression of Toll-like Receptors on Monocytes After Stimulation with the 3-o-C12-HSL Molecule from *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol* 2012;**65**:384–9. doi:10.1007/s00284-012-0162-z
- 212 Bao L, Yu J, Zhong H, *et al.* Expression of toll-like receptors in T lymphocytes stimulated with N -(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 2017;**125**:553–7. doi:10.1111/apm.12690
- 213 Horke S, Witte I, Altenhöfer S, *et al.* Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing signal N -(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochem J* 2010;**426**:73–83. doi:10.1042/BJ20091414
- 214 Kaper JB, Sperandio V. Bacterial Cell-to-Cell Signaling in the Gastrointestinal Tract. *Infect Immun* 2005;**73**:3197–209. doi:10.1128/IAI.73.6.3197-3209.2005
- 215 Hsiao A, Ahmed AMS, Subramanian S, *et al.* Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature* 2014;**515**:423–6. doi:10.1038/nature13738
- 216 Lukás F, Gorenc G, Kopecný J. Detection of possible AI-2-mediated quorum sensing system in commensal intestinal bacteria. *Folia Microbiol (Praha)* 2008;**53**:221–4. doi:10.1007/s12223-008-0030-1

- 217 Antunes LCM, Queiroz Ferreira L, Oliveira Ferreira E, *et al.* Bacteroides species produce Vibrio harveyi autoinducer 2-related molecules. *Anaerobe* 2005;**11**:295–301. doi:10.1016/j.anaerobe.2005.03.003
- 218 Thompson JA, Oliveira RA, Djukovic A, *et al.* Manipulation of the Quorum Sensing Signal AI-2 Affects the Antibiotic-Treated Gut Microbiota. *Cell Rep* 2015;**10**:1861–71. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.049
- 219 Wagner-Döbler I, Thiel V, Eberl L, *et al.* Discovery of Complex Mixtures of Novel Long-Chain Quorum Sensing Signals in Free-Living and Host-Associated Marine Alphaproteobacteria. *ChemBioChem* 2005;**6**:2195–206. doi:10.1002/cbic.200500189
- 220 Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Toulza E, *et al.* Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling metagenomic database. *Aquat Microb Ecol* 2015;**74**:107–19. doi:10.3354/ame01734
- 221 Erickson DL, Nsereko VL, Morgavi DP, *et al.* Evidence of quorum sensing in the rumen ecosystem: detection of N -acyl homoserine lactone autoinducers in ruminal contents. *Can J Microbiol* 2002;**48**:374–8. doi:10.1139/w02-022
- 222 Kumari A, Pasini P, Daunert S. Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples. *Anal Bioanal Chem* 2008;**391**:1619–27. doi:10.1007/s00216-008-2002-3
- 223 Swearingen MC, Sabag-Daigle A, Ahmer BMM. Are There Acyl-Homoserine Lactones within Mammalian Intestines? *J Bacteriol* 2013;**195**:173–9. doi:10.1128/JB.01341-12
- 224 Boehm D, Krzystek-Korpaczka M, Neubauer K, *et al.* Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis: *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**:93–9. doi:10.1002/ibd.20582
- 225 Karban A, Hartman C, Eliakim R, *et al.* Paraoxonase (PON)1 192R Allele Carriage is Associated with Reduced Risk of Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci* 2007;**52**:2707–15. doi:10.1007/s10620-006-9700-5
- 226 Jostins L, Ripke S, Weersma RK, *et al.* Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;**491**:119–24. doi:10.1038/nature11582
- 227 Sokol H, Leducq V, Aschard H, *et al.* Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 2017;**66**:1039–48. doi:10.1136/gutjnl-2015-310746
- 228 Moss CW, Lambert-Fair MA. Location of double bonds in monounsaturated fatty acids of Campylobacter cryaerophila with dimethyl disulfide derivatives and combined gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 1989;**27**:1467–1470.
- 229 Holm A, Vikström E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front Plant Sci* 2014;**5**. doi:10.3389/fpls.2014.00309
- 230 Siegel D, Andrae K, Proske M, *et al.* Dynamic covalent hydrazine chemistry as a selective extraction and cleanup technique for the quantification of the Fusarium mycotoxin zearalenone in edible oils. *J Chromatogr A* 2010;**1217**:2206–15. doi:10.1016/j.chroma.2010.02.019

- 231 Klement E, Lipinski Z, Kupihár Z, *et al.* Enrichment of O-GlcNAc Modified Proteins by the Periodate Oxidation–Hydrazide Resin Capture Approach. *J Proteome Res* 2010;**9**:2200–6. doi:10.1021/pr900984h
- 232 Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Xenobiotics Shape the Physiology and Gene Expression of the Active Human Gut Microbiome. *Cell* 2013;**152**:39–50. doi:10.1016/j.cell.2012.10.052
- 233 Fumery M, Seksik P, Auzolle C, *et al.* Postoperative Complications after Ileocecal Resection in Crohn’s Disease: A Prospective Study From the REMIND Group. *Am J Gastroenterol* 2017;**112**:337–45. doi:10.1038/ajg.2016.541
- 234 Kaufmann GF, Sartorio R, Lee S-H, *et al.* Revisiting quorum sensing: discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:309–314.
- 235 Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M. More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol* 2009;**17**:189–95. doi:10.1016/j.tim.2009.02.001
- 236 Denizot J, Sivignon A, Barreau F, *et al.* Adherent-invasive Escherichia coli induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn’s disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2012;**18**:294–304. doi:10.1002/ibd.21787

ANNEXES

ANNEXE 1 : Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique

La Revue de médecine interne 37 (2016) 418–423



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Carrefour des spécialités

Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique



Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications

C. Landman^{a,b}, E. Quévrain^{a,*}

^a Inserm ERL 1157, CNRS UMR 7203 LBM and inflammation-immunopathology-biotherapy department (DHU i2B), CHU Saint-Antoine, Sorbonne universités – UPMC université Paris 06, 27, rue de Chaligny, 75012 Paris, France

^b Service de gastroentérologie et nutrition, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184, rue du Faubourg-Saint-Antoine, 75012 Paris, France

IN F O A R T I C L E

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 31 décembre 2015

Mots clés :
Microbiote
Dysbiose
Système immunitaire
Maladies inflammatoires chroniques intestinales
Obésité

Keywords:
Gut microbiota
Dysbiosis
Immune system
Inflammatory bowel diseases
Obesity

R É S U M É

Le microbiote intestinal humain est composé de 10^{14} bactéries ainsi que d'autres micro-organismes comme les virus, les champignons et les archées. L'étude du microbiote intestinal a dévoilé le rôle fondamental qu'il joue dans la physiologie intestinale mais aussi dans la santé humaine de façon plus générale, comme un véritable « organe caché ». Dans cette revue, nous exposons la structure et le rôle du microbiote intestinal ainsi que son implication en pathologie humaine. Après la colonisation bactérienne du tube digestif chez le nourrisson, la composition du microbiote intestinal est unique à chaque individu bien que plus de 95 % des bactéries le composant puissent être réparties en 4 phyla majeurs. Des approches culture-indépendantes et, plus récemment, l'avènement du séquençage haut débit ont permis de décrire précisément la structure et la diversité du microbiote intestinal ainsi que son altération en pathologie. Le microbiote intestinal est impliqué dans la maturation du système immunitaire et dans de nombreuses voies métaboliques fondamentales comme la fermentation des sucres et des protéines ainsi que le métabolisme des acides biliaires et des xénobiotiques. Le déséquilibre des populations du microbiote intestinal ou dysbiose a des conséquences fonctionnelles importantes et est impliqué dans de nombreuses pathologies digestives (maladies inflammatoires chroniques intestinales, cancer colorectal, etc.) mais aussi dans l'obésité et l'autisme. Ces observations ont conduit à l'émergence de nombreuses études sur les traitements visant à restaurer l'équilibre du microbiote intestinal comme les probiotiques ou la transplantation du microbiote fécal. Mais des travaux récents sur l'activité de métabolites issus du microbiote pourraient conduire à des perspectives thérapeutiques prometteuses.

© 2015 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

A B S T R A C T

The human gut contains 10^{14} bacteria and many other micro-organisms such as Archaea, viruses and fungi. Studying the gut microbiota showed how this entity participates to gut physiology and beyond this to human health, as a real "hidden organ". In this review, we aimed to bring information about gut microbiota, its structure, its roles and its implication in human pathology. After bacterial colonization in infant, intestinal microbial composition is unique for each individual although more than 95% can be assigned to four major phyla. The use of culture independent methods and more recently the development of high throughput sequencing allowed to depict precisely gut microbiota structure and diversity as well as its alteration in diseases. Gut microbiota is implicated in the maturation of the host immune system and in many fundamental metabolic pathways including sugars and proteins fermentation and metabolism of bile acids and xenobiotics. Imbalance of gut microbial populations or dysbiosis has important functional consequences and is implicated in many digestive diseases (inflammatory bowel diseases, colorectal cancer, etc.) but also in obesity and autism. These observations have led to a surge of studies exploring therapeutics which aims to restore gut microbiota equilibrium such as probiotics or fecal microbiota

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : elodie.quevrain@yahoo.fr (E. Quévrain).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2015.12.012>

0248-8663/© 2015 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

transplantation. But recent research also investigates biological activity of microbial products which could lead to interesting therapeutics leads.

© 2015 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe qui comprend l'ensemble des êtres unicellulaires hébergés dans le tube digestif, principalement des bactéries mais aussi des virus, des champignons et des archées. Après la colonisation du tube digestif de la naissance à l'âge de 2 ans environ, le microbiote intestinal est propre à chaque individu et stable dans le temps. Par ailleurs, il existe un phénomène de résilience, c'est-à-dire le retour à l'équilibre après un événement perturbateur (comme la prise d'antibiotiques par exemple).

Si la composition en termes d'espèces est propre à chaque individu, les caractéristiques sont très conservées en termes de composition au niveau des phyla et grands groupes phylogénétiques. Et les caractéristiques en termes de fonctions physiologiques sont très proches d'un individu à l'autre. Toutes ces propriétés font du microbiote intestinal un véritable « organe caché ». L'objet de cette revue est d'en décrire la composition et les fonctions tout en présentant les différentes méthodes d'étude du microbiote intestinal et ses implications en santé humaine.

1. Description du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est composé de 10^{14} micro-organismes réparti en 160 espèces bactériennes chez un individu donné parmi le millier d'espèces qui ont pu être identifiées dans différentes cohortes humaines. Ces 10^{14} bactéries sont réparties en 4 phyla bactériens : firmicutes, bacteroidetes, actinobacteria, et proteobacteria. Les firmicutes et les bacteroidetes constituent les deux phyla dominants du microbiote avec une représentativité respective de 60–75 % et 30–40 %.

Comme dans tout écosystème bactérien, plus de 90 % des espèces du microbiote intestinal ne sont pas cultivables. Vivant dans la plupart des cas en absence d'oxygène, dans un environnement dont les propriétés physicochimiques sont souvent difficiles à caractériser et à reproduire, ces bactéries intestinales ne peuvent pas être cultivées en laboratoire. Des approches culture-indépendantes basées sur le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S, par exemple, ont été développées afin d'appréhender la grande diversité du microbiote intestinal. Deux types d'échantillons peuvent être analysés afin d'accéder aux espèces bactériennes composant l'écosystème intestinal : en effet, les populations bactériennes liées à la muqueuse et celles contenues dans la lumière intestinale doivent être distinguées. Elles présentent des fonctions et une composition bien différentes. Le biofilm composant le microbiote muqueux à la surface de l'épithélium intestinal possède des fonctions métaboliques particulières de transformation des aliments et d'échange de nutriments ainsi qu'une fonction d'induction et d'éducation du système immunitaire de l'hôte. Le microbiote issu d'échantillons fécaux est le plus souvent étudié en raison de la facilité de collecte des échantillons. Même si l'importance des différences dans la composition et le rôle du microbiote fécal versus le microbiote muqueux est reconnue, elle demeure à ce jour mal évaluée.

Une étude publiée en 2005 dans la revue *Science* par une équipe américaine de l'université de Stanford décrit le microbiote intestinal muqueux et fécal d'individus sains [1]. Ces auteurs ont obtenu 11 831 séquences codant l'ARN ribosomal 16S bactériens et 1524 séquences codant le gène du 16S présent chez les Archées.

L'analyse phylogénétique de l'ensemble de ces séquences a permis l'identification de 395 phylotypes bactériens et d'un seul phylotype d'archée correspondant à *Methanobrevibacter smithii*. Sur les 395 phylotypes, 301 correspondent à des firmicutes et 95 % de ces séquences appartiennent à des bactéries du groupe *Clostridia*. Certaines de ces séquences (42) correspondent à des bactéries produisant du butyrate et appartenant aux clusters IV, XIVA et XVI de ce groupe *Clostridia*. Parmi les 65 séquences correspondant à des bacteroidetes, de plus grandes variations ont été observées entre les individus. Dans ce phylum, *Bacteroidetes thetaiotaomicron* a été retrouvé chez tous les individus. Ensuite, quelques séquences seulement correspondent aux proteobacteria, aux actinobacteria, aux fusobacteria et aux verrucomicrobia ont été identifiées.

En raison d'une diminution des coûts du séquençage haut-débit de l'ADN et de l'amélioration des outils d'analyse bio-informatique, il est aujourd'hui possible de comparer la composition des communautés bactériennes du tractus digestif d'un grand nombre de personnes (enfant/adulte/personne âgée, patients atteints d'obésité, patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, etc.). L'analyse de l'ensemble des génomes bactériens présent dans un écosystème donné est appelée analyse métagénomique. De grands programmes d'analyse du métagénome intestinal humain ont été entrepris ces dernières années (MetaHIT).

Dans ce programme MetaHIT, l'analyse de 396 échantillons de selles a permis d'obtenir un catalogue de 3,9 millions de gènes répartis dans 7381 groupes de co-abondance de gènes. Environ 10 % de ces groupes correspondent à des bactéries (plus des 3/4 de ces bactéries n'ayant jamais été référencées dans les bases de données). Les 90 % restants correspondent à des groupes de virus bactériens (bactériophages), de plasmides (fragments d'ADN bactériens circulaires) ou encore des gènes qui protègent les bactéries d'attaques virales (connus sous le nom de séquences CRISPR) [2].

Selon un séquençage du métagénome d'échantillons de selles collectés auprès de 124 Européens en 2009, il y aurait de 1000 à 1150 espèces bactériennes différentes dans le microbiote intestinal. Chaque individu hébergerait environ 160 de ces espèces [3]. Comme attendu, parmi les espèces prédominantes du microbiote, les auteurs ont trouvé des représentants des phyla firmicutes (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium leptum*, *Enterococcus faecalis*, *Roseburia intestinalis*, etc.) et bacteroidetes (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, etc.), des groupes Dorea/Eubacterium/Ruminococcus (*Dorea longicatena*, *Ruminococcus torque*, *Eubacterium hallii*, etc.). Ont également été identifiés des espèces de bifidobacteria, proteobacteria et des représentants du groupe Streptococci/Lactobacilli (*Streptococcus thermophilus*, etc.).

Au-delà de l'identification des espèces bactériennes présentes dans l'écosystème intestinal en condition de normobiose, ces analyses métagénomiques permettent également de caractériser les modifications de la composition et les modifications fonctionnelles du microbiote intestinal.

2. Fonctions du microbiote intestinal

La présence permanente d'une importante biomasse bactérienne dans l'intestin exerce des effets physiologiques, pour la

plupart bénéfiques pour l'hôte. Le microbiote intestinal peut même être considéré comme un véritable organe à part entière.

2.1. Effet barrière et fonctions immunitaires

Il existe dans la lumière intestinale une compétition pour les nutriments et les sites d'adhérence épithéliaux entre pathogènes et bactéries commensales. Par ailleurs, le microbiote produit des bactériocines et il est capable de stimuler la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales. Il induit également la production des IgA sécrétoires et favorise le bon fonctionnement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales [4], ce qui diminue l'invasion par des bactéries pathogènes.

Outre ses propriétés de barrière, le microbiote intestinal joue un rôle fondamental dans le développement et la maturation du système immunitaire. La découverte de cette fonction essentielle vient de l'observation des différences entre souris axéniques (élevées en milieu stériles et donc dépourvues de microbiote) et souris conventionnelles (élevées en animalerie classique) [5]. Les souris axéniques présentaient de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal : hypoplasie des plaques de Peyer, diminution des lymphocytes intra-épithéliaux, déficit en certaines populations lymphocytaires T, diminution de la sécrétion intestinale d'IgA, de la concentration d'immunoglobulines sériques et de la production de cytokines. Mais le plus intéressant est que ces anomalies ne se cantonnaient pas au système immunitaire intestinal, puisqu'on observait dans la rate et les ganglions lymphatiques des zones lymphocytaires atrophiées. Par ailleurs, quelques semaines après l'inoculation du microbiote de souris conventionnelles à ces souris axéniques, l'ensemble des ces anomalies disparaissaient. Au-delà de ces observations sur les fonctions globales du microbiote, il semble que certaines espèces bactériennes aient des propriétés spécifiques. L'homéostasie intestinale est notamment sous la dépendance d'un équilibre entre les lymphocytes T effecteurs (Th17 principalement) et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Il a récemment été montré que certaines bactéries stimulent particulièrement les populations Th17 intestinales [6] alors que d'autres stimulent les Treg [7] par l'intermédiaire des acides gras à chaînes courtes qu'elles produisent [8]. Elles participent ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale.

2.2. Fonctions métaboliques

Les principales sources d'énergie du microbiote intestinal sont les glucides et les protéines contenues dans les fibres alimentaires non digérées par l'hôte dans le tractus digestif supérieur et qui parviennent dans le côlon. La nature et la quantité des substrats disponibles dépendent donc des individus et de leur régime alimentaire qui constitue un facteur environnemental susceptible d'influencer l'équilibre du microbiote. La biotransformation de ces différents substrats par le microbiote colique, d'une part, permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et, d'autre part, génère la production d'une diversité de métabolites qui sont pour la plupart absorbés et utilisés par l'hôte.

2.2.1. Métabolisme des glucides

Selon les individus et leur régime alimentaire, 10 à 60 g de glucides fermentescibles par jour parviennent au côlon. Différents groupes bactériens du microbiote colique avec des activités complémentaires forment une chaîne trophique de dégradation anaérobie des polymères glucidiques en métabolites fermentaires. La première étape est la dégradation des différents polymères en fragments plus petits (oligosides, oses, etc.) qui fait intervenir une grande variété d'hydrolases (polysaccharidase, glycosidases, etc.). Ces enzymes sont produites par les bactéries du microbiote colique dites « fibrolytiques », appartenant principalement aux genres

Bacteroides, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia*. Les bactéries glycolytiques transforment les glucides ainsi produits en pyruvate en utilisant la voie de la glycolyse. Par la suite, le pyruvate est lui-même transformé via différentes voies métaboliques en acides gras à chaînes courtes, produits finaux de la fermentation. Il s'agit de l'acétate produit par la majorité des espèces prédominantes du côlon (*Bacteroides*, *Clostridium*...), du propionate synthétisé principalement par les espèces du genre *Bacteroides* et également par *Propionibacterium* et *Veillonella* et enfin du butyrate produit par les espèces des genres *Eubacterium*, *Coproccoccus*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* [9].

2.2.2. Métabolisme des gaz

L'hydrogène est le gaz majoritairement produit lors des processus fermentaires, et ce, en grande quantité de façon quotidienne dans le côlon. Son élimination, essentielle à l'efficacité du processus fermentaire, est possible de plusieurs manières. Il peut être excrété par l'émission de gaz rectaux ou par voie pulmonaire, mais la plus grande partie de l'hydrogène est transformée in situ par des bactéries du microbiote colique dites hydrogénotrophes [10]. Les trois types de transformation principaux sont : en méthane par les archées méthanogènes (présents dans le microbiote colique de 30 à 50% des adultes), en acétate par les bactéries acétogènes, et enfin, en sulfures au potentiel délétère pour le colonocyte par les bactéries sulfatoréductrices (dont le genre prédominant est *Desulfovibrio*).

2.2.3. Métabolisme des protéines

La biodégradation des protéines est quantitativement moins importante que celle des glucides mais elle est fondamentale car les protéines représentent la principale source azotée des bactéries coliques. Chez certaines espèces (des genres *Veillonella*, *Fusibacterium*, *Clostridium*, etc.) ne fermentant pas les glucides, les acides aminés sont même utilisés comme source principale d'énergie. Le métabolisme des protéines fait intervenir plusieurs espèces ayant des activités complémentaires. Les bactéries dites « protéolytiques », appartenant aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*, sont capables par leur activité protéasique d'hydrolyser les protéines en petits peptides. Certaines espèces bactériennes peuvent assimiler ces peptides, ce qui s'accompagne fréquemment de la libération d'acides aminés libres qui seront utilisés par d'autres bactéries incapables d'assimiler directement des peptides. La fermentation des acides aminés utilise plusieurs réactions d'oxydation et de réduction dont la principale est la voie réductrice de désamination et aboutit comme la fermentation des glucides à la formation d'acides gras à chaînes courtes (acétate, propionate, butyrate) mais aussi d'ammoniac. Néanmoins, de nombreux autres composés comme des phénols, des acides dicarboxyliques et des acides gras ramifiés (isobutyrate, isovalerate, etc.) sont également produits. Les composés phénoliques et indoliques, issus de la dégradation des acides aminés aromatiques et qui sont potentiellement toxiques pour l'hôte, sont absorbés et détoxifiés dans la muqueuse colique, puis excrétés dans les urines. L'ammoniac est également absorbé dans le côlon, il rejoint le foie par la circulation portale où il est converti en urée qui sera éliminée par voie urinaire. L'ammoniac est aussi une source majeure d'azote pour un grand nombre de bactéries du microbiote colique qui l'utilise pour la synthèse d'acides aminés grâce à leur activité aminotransférase.

2.2.4. Métabolisme des lipides

Les lipides de la lumière colique comprennent les lipides non absorbés dans l'intestin grêle, ceux provenant de la desquamation des colonocytes et les lipides bactériens. Ces acides gras sont transformés (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation...) par les bactéries du microbiote colique. Le cholestérol colique provient pour la majorité de la bile (70%) et pour le reste de

l'alimentation (20%) et de la desquamation des cellules épithéliales intestinales (10%). Il est converti par le microbiote en coprostanol qui n'est pas absorbé et donc est éliminé dans les fèces [11]. Cette efficacité est très variable d'un sujet à l'autre et le taux fécal de coprostanol pourrait être impliqué dans la réduction du risque cardiovasculaire et la cancérogénèse colique. Les acides biliaires, produit de transformation du cholestérol par le foie, sont conjugués à la glycine ou à la taurine, ce qui a pour conséquence une amphiphilie accrue. Quatre-vingt quinze pourcent des acides biliaires suivent le cycle entéro-hépatique: sécrétion biliaire, réabsorption au niveau de l'iléon terminal, retour au foie via le système porte, avant d'être à nouveau sécrété dans la bile. Seuls 5% des acides biliaires sécrétés dans la bile parviennent donc au côlon où ils sont métabolisés (déconjugaison, oxydation, épimérisation, 7-alpha-déshydroxylation, désulfatation, etc.) par les bactéries du microbiote en acides biliaires dits secondaires [12]. La déconjugaison (espèces des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, etc.) rend les acides biliaires plus hydrophobes et favorise leur absorption passive. Les acides cholique et chénodésoxycholique, acides biliaires primaires principaux chez l'homme, sont transformés par 7-alpha-déshydroxylation par les espèces du genre *Clostridium* en acides desoxycholique et lithocholique (acides biliaires secondaires) qui pourraient avoir un effet carcinogène sur la muqueuse colique. Les hormones stéroïdes et des xénobiotiques suivent également un cycle entéro-hépatique et les mêmes voies métaboliques avec conjugaison hépatique et déconjugaison par le microbiote colique.

En considérant le rôle fondamental que le microbiote intestinal joue dans la réponse immunitaire ainsi que dans différentes voies métaboliques essentielles de l'hôte, on peut facilement imaginer l'impact fonctionnel d'un déséquilibre de ce microbiote sur le développement de différentes pathologies immunitaires et métaboliques.

3. Implication du microbiote en pathologie humaine

Il est aujourd'hui clairement établi que le microbiote intestinal joue un rôle dans certaines pathologies du système digestif (cancer colorectal, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) mais également dans les cas d'obésité et d'autisme.

3.1. Microbiote intestinal et obésité

L'augmentation de la prévalence de l'obésité ces dernières années est telle qu'elle ne peut être uniquement due à des facteurs génétiques. Les chercheurs se sont intéressés au microbiote intestinal comme pouvant être un facteur environnemental influençant l'obésité. Son rôle dans le stockage des graisses et l'obésité a donc été récemment investigué. Des résultats parus dans le journal *Nature* en 2006 suggèrent que le microbiote intestinal contribue à l'absorption par l'hôte de glucides et de lipides et régule le stockage des graisses [13]. Ces effets seraient liés à l'induction par le microbiote de la lipogenèse hépatique et du stockage des triglycérides dans les adipocytes. D'autre part, la même équipe a montré que le microbiote de souris obèses (*ob/ob*), invalidées pour le gène de la leptine, comportait une proportion anormalement élevée de firmicutes et anormalement basse de bacteroidetes. De plus, le transfert du microbiote de ces souris obèses à des souris axéniques induisait une augmentation de l'extraction énergétique des aliments ingérés supérieure à celle induite par le transfert d'un microbiote de souris minces. Chez l'homme obèse, il existe, dans le microbiote fécal, une proportion augmentée de firmicutes et diminuée de bacteroidetes, comparativement aux sujets minces et la perte de poids semble corrélée avec l'augmentation de la proportion de bacteroidetes.

Ces données récentes suggèrent donc un lien entre le microbiote intestinal et l'obésité [13,14].

3.2. Microbiote intestinal et cancer

La prise en compte de la composition du microbiote intestinal s'annonce comme étant une nouvelle avancée dans la lutte contre le cancer du colon. En effet, plusieurs travaux s'accordent à dire que certaines des bactéries présentes au niveau du côlon pourraient en favoriser le développement.

Il existe une dysbiose, c'est-à-dire une modification de la composition du microbiote intestinal, chez les sujets souffrant d'un cancer colorectal [15]. Dans cette étude, les auteurs ont établi une carte de la dysbiose associée au cancer colorectal en s'intéressant aux espèces bactériennes colonisant les tumeurs versus celles retrouvées dans les zones de muqueuses saines adjacentes. Ils ont ainsi montré que les zones du colon touchées par les tumeurs présentaient moins de firmicutes et plus de bacteroidetes que les zones saines et représentaient une niche pour les coriobacteria (actinobacteria).

Il a également été montré l'implication de toxines bactériennes dans la survenue du cancer colorectal. Par exemple, la génotoxicité de souches d'*Escherichia coli* produisant la colibactine, une toxine capable d'induire des cassures double-brin de l'ADN et une instabilité génétique au sein de cellules épithéliales intestinales en culture a été largement démontrée [16]. La colibactine a été montrée comme promotrice de tumeurs colorectales [17].

3.3. Microbiote intestinal et autisme

Des études préliminaires ont montré qu'il existait une forme de dysbiose chez les enfants autistes avec une diminution de *Akkermansia muciniphila* et de *Bifidobacterium* spp. dans les selles de ces patients [18]. Une autre étude récente a montré, sur des biopsies réalisées chez des enfants présentant un trouble autistique et souffrant de troubles gastro-intestinaux, une augmentation des phylotypes appartenant à la famille Alcaligenaceae et au genre *Sutterella*, particulièrement les espèces *S. wadsworthensis* et *S. stercoricanis* [19].

Pour témoigner de l'influence des bactéries intestinales sur le comportement, l'administration de certains probiotiques a été étudiée. Par exemple, la consommation pendant 2 mois du probiotique *Lactobacillus casei* conduisait à une diminution de l'anxiété chez des patients atteints du syndrome de fatigue chronique [20]. En 2013, un groupe de chercheurs américains a montré que, chez des souris avec des troubles autistiques, l'intestin contenait moins de bactéries de l'espèce *Bacteroides fragilis* que chez les souris témoins. L'administration de cette souche bactérienne a permis une amélioration des troubles psychomoteurs liés à l'anxiété et une amélioration de la communication entre individus [21].

3.4. Microbiote intestinal et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Des études moléculaires, indépendantes de la culture, basées pour la plupart sur le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, ont permis de mettre en évidence certaines anomalies du microbiote intestinal au cours des MICI. Ces anomalies sont :

- une forte instabilité du microbiote au cours du temps ;
- la présence d'environ 30% de bactéries inhabituelles ;
- une restriction de la biodiversité généralement aux dépens du phylum des firmicutes ;
- une augmentation de la concentration bactérienne muqueuse [22].

Cette dysbiose est caractérisée par un déficit en certaines bactéries, telles que *F. prausnitzii*, du groupe *C. leptum*, mais aussi par une augmentation de certains pathogènes tels que *E. coli* AIEC ou *Mycobacterium avium paratuberculosis* [23,24]. La dysbiose est donc un élément clé dans la physiopathologie des MICI. En comparant le profil du microbiote intestinal obtenu par qPCR sur les selles de patients atteints de MICI la dysbiose, et particulièrement le déficit en *F. prausnitzii*, semble plus marquée chez les patients en poussée par rapport à ceux en rémission. Cette observation nous incite à penser qu'une dysbiose plus marquée pourrait être prédictive de rechute. Récemment, une étude microbiologique, insérée dans la cohorte STORI du GETAID, a permis de mettre en évidence la dysbiose associée à la maladie de Crohn (MC) comme facteur prédictif de récurrence clinique après arrêt du traitement par infliximab au cours d'une MC bien contrôlée. Ces travaux mettent en évidence une dysbiose au cours de la MC plus marquée chez les futurs rechuteurs avant même l'arrêt du traitement par infliximab. La quantité de bactéries appartenant aux groupes *Clostridium coccoides* et *Bacteroides* (et apparentés) ainsi que la prévalence de l'espèce *F. prausnitzii* dans les selles permet de discriminer les patients qui resteront en rémission des futurs rechuteurs [25].

3.5. Les pistes de traitement utilisant le microbiote pour le traitement des pathologies intestinales

3.5.1. Le transfert de flore

Cette technique a montré des résultats encourageants en cas d'infections récurrentes par *Clostridium difficile* ou dans le traitement de troubles intestinaux après un traitement antibiotique [26]. Cependant, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé préconise la limitation de la transplantation de flore fécale aux cas graves et pour lesquels, les traitements conventionnels n'ont pas d'effet.

Récemment, des médecins néerlandais ont recensé les essais de transplantation de microbiote fécal dans différentes pathologies digestives. Il a été montré que dans les cas d'infections récidivantes à *C. difficile*, la transplantation de microbiote avait une efficacité de 90%. Dans le cas de la rectocolite hémorragique (RCH), les résultats sont prometteurs puisqu'on observe jusqu'à 68% de rémission après la transplantation. Dans le cas de la MC, de la constipation chronique et du syndrome de l'intestin irritable, les études sont encore trop limitées en termes de nombre de patients pour livrer des résultats interprétables [27].

3.5.2. L'utilisation des probiotiques

Par définition, les probiotiques sont des micro-organismes vivants, non pathogènes, qui lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, impactent positivement sur la santé de l'hôte. Les effets bénéfiques apportés par les probiotiques peuvent être : une normalisation de la perméabilité membranaire, un retour à un état de normobiose ou encore une régulation négative de la réponse intestinale pro-inflammatoire. Plusieurs études ont déjà montré l'efficacité des probiotiques dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : ainsi par exemple, la souche *E. coli* Nissle 1917 (dénomination commerciale Mutaflor®) présente une efficacité similaire à celle d'anti-inflammatoires de synthèse tels que la mésalazine dans le maintien en rémission de la RCH. À ce jour, les preuves de l'efficacité des probiotiques dans le maintien en rémission et de la prévention des rechutes en postopératoire dans les cas de MC, restent peu nombreuses et surtout contradictoires.

3.5.3. La recherche et l'utilisation de molécules d'origine bactérienne

Dans la course à la recherche de traitement pour soulager et soigner les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques

de l'intestin, les chercheurs s'intéressent aux métabolites issus des bactéries composant le microbiote intestinal.

Par exemple, la perte de *F. prausnitzii* associée au développement de la MC a suggéré un rôle anti-inflammatoire de cette bactérie. Cela a pu être vérifié in vitro sur des modèles cellulaires épithéliaux intestinaux et in vivo sur un modèle de colite murine [28]. L'identification des composés bactériens responsables de cette activité anti-inflammatoire a fait l'objet de recherches approfondies. Un fractionnement bioguidé du surnageant de *F. prausnitzii* a permis d'attribuer l'activité anti-inflammatoire à une protéine bactérienne de 15 kDa, la protéine MAM et à 7 peptides issus de cette protéine [29]. L'utilisation de cette protéine pourrait être envisagée comme traitement de l'inflammation intestinale ou comme marqueur de la dysbiose associée à la MC.

4. Conclusion

Le microbiote intestinal humain contient, entre autres micro-organismes, environ 10^{14} bactéries et représente un écosystème extrêmement complexe. Plus de 90% des espèces du microbiote intestinal ne sont pas cultivables en laboratoire et il a fallu attendre l'avènement de méthodes indépendantes de la culture pour définir précisément la structure à l'échelle des phyla et des grands groupes phylogénétiques et mieux caractériser la diversité du microbiote intestinal. Au-delà de l'étude de sa composition, il a été mis en évidence que le microbiote intestinal exerce des fonctions majeures pour la physiologie de l'hôte à la fois métaboliques mais aussi d'effet barrière et de maturation du système immunitaire. Des modifications structurales et, par conséquent, fonctionnelles du microbiote sont impliquées dans de nombreuses pathologies humaines, notamment digestives et métaboliques. Outre les traitements modulant le microbiote (transfert de flore, probiotiques...) qui permettent ainsi de moduler certaines fonctions physiologiques, la recherche sur les métabolites issus du microbiote pourrait conduire à terme à de nouvelles perspectives thérapeutiques prometteuses.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargeant M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635–8.
- [2] Nielsen HB, Almeida M, Juncker AS, Rasmussen S, Li J, Sunagawa S, et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat Biotechnol* 2014;32:822–8.
- [3] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59–65.
- [4] Hooper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol* 2004;12:129–34.
- [5] Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4:478–85.
- [6] Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009;31:677–89.
- [7] Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011;331:337–41.
- [8] Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013;341:569–73.
- [9] Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002;217:133–9.
- [10] Christl SU, Murgatroyd PR, Gibson GR, Cummings JH. Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology* 1992;102:1269–77.

- [11] Lichtenstein AH. Intestinal cholesterol metabolism. *Ann Med* 1990;22:49–52.
- [12] Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006;47:241–59.
- [13] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027–31.
- [14] Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915–20.
- [15] Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WHM, Roelofs R, Boleij A, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One* 2011;6.
- [16] Nougayrede JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006;313:848–51.
- [17] Arthur JC, Perez-Chanona E, Muhlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan TJ, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012;338:120–3.
- [18] Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microb* 2011;77:6718–21.
- [19] Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *MBio* 2012;3.
- [20] Rao AV, Bested AC, Beaulne TM, Katzman MA, Iorio C, Berardi JM, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog* 2009;1.
- [21] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 2013;155:1451–63.
- [22] Seksik P. [Gut microbiota and IBD]. *Gastroenterol Clin Biol* 2010;34(Suppl. 1):S44–51.
- [23] Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1183–9.
- [24] Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405–13.
- [25] Rajca S, Grondin V, Louis E, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, et al. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:978–86.
- [26] Dinh A, Bouchand F, Le Monnier A. [Current treatment and epidemiology of *Clostridium difficile* infections]. *Rev Med Interne* 2015;36:569–602.
- [27] Rossen NG, MacDonald JK, de Vries EM, D'Haens GR, de Vos WM, Zoetendal EG, et al. Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: a systematic review. *World J Gastroenterol* 2015;21:5359–71.
- [28] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16731–6.
- [29] Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 2015.

Chapitre Livre réanimation Jean-Michel Boles

Thème 8 PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL DIGESTIF ET METABOLISME

35 Le microbiote

Ph.Seksik^(1,2), Cécilia Landman^(1,2), Elodie Quevrain⁽²⁾

1. AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Gastroenterologie et Nutrition, F-75012, Paris, France
2. Sorbonne Universités - UPMC Univ Paris 06, INSERM ERL 1157, CNRS UMR 7203 LBM and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU i2B), CHU Saint-Antoine 27 rue de Chaligny, 75012, Paris, France

1. Le microbiote dans l'écosystème. Biodiversité, stabilité, résilience

Le microbiote intestinal constitue un écosystème complexe dont l'impact sur la santé de l'Homme est aujourd'hui reconnu. Le tube digestif héberge des êtres unicellulaires comme des bactéries mais aussi des virus, des champignons et des micro-organismes très particuliers appelés les archaea qui se différencient des bactéries et du règne animal. Parmi tous ces micro-organismes, les bactéries forment le groupe le plus représenté et l'on considèrera donc dans le présent ouvrage que les données se référant au microbiote intestinal concernent les bactéries qui colonisent notre tube digestif. Ce compartiment devient un élément important de la physiologie humaine à mesure que l'on reconnaît plusieurs fonctions physiologiques portées par ce microbiote. Même si son étude et son impact restent encore du domaine de la recherche, une bonne connaissance de cette entité apparaît nécessaire pour appréhender les avancées en cours visant à manipuler ce microbiote dans un but thérapeutique.

1.1. Biodiversité et mise en place :

Le microbiote intestinal humain contient environ 10^{14} bactéries réparties en 4 phyla bactériens: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, et *Proteobacteria* et représente l'un des écosystèmes les plus complexes présents à la surface de la terre. Le microbiote intestinal d'un individu adulte est représenté par plusieurs centaines d'espèces bactériennes différentes et est stable au cours du temps (1, 2). Plus de 80% des espèces bactériennes appartenant à cet écosystème ne sont pas cultivables. La plus grande partie des informations concernant cet écosystème a donc été générée grâce à des méthodes moléculaires basées sur le séquençage du gène bactérien codant l'ARN ribosomal 16S. La majorité des études ont été réalisées sur des échantillons de selles. La combinaison de méthodes culture-dépendantes et culture-indépendantes a permis de déterminer que les genres *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* et *Fusobacterium* dominaient le microbiote fécal. A la naissance, le tube digestif du nouveau-né est dépourvu de bactérie. La colonisation microbienne débute dès les premiers instants de vie. En l'absence des mécanismes immunitaires sophistiqués de l'adulte, le tube digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif et les niveaux de population y atteignent rapidement 10^{11} bactéries par gramme de contenu. La colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé, sous la dépendance de facteurs exogènes (d'origine maternelle, alimentaire) et endogènes tels que les sécrétions du tube digestif mais aussi les produits des premiers micro-organismes colonisateurs qui globalement conditionnent la physico-chimie du biotope (3). Les bactéries anaérobies qui dominent le microbiote intestinal de l'adulte font partie des premiers micro-organismes rencontrés lors d'une naissance par voie basse. La mise en place successive d'espèces bactériennes conduit vers l'âge de deux ans à un microbiote stable au plan fonctionnel. Ces bactéries se répartissent tout le long du tube digestif selon des concentrations croissantes depuis des parties hautes jusqu'au colon distal. Il existe quelques bactéries dans l'estomac et les parties supérieures de l'intestin grêle. Les concentrations vont croissantes atteignant 10^8 bactéries par gramme de contenu dans l'iléon terminal. Les bactéries anaérobies facultatives dominent dans l'intestin grêle alors que les bactéries anaérobies strictes dominent les bactéries anaérobies facultatives dans le côlon distal et les selles par un facteur de 1000 environ. La densité bactérienne atteint son maximum dans le côlon distal avec 10^{11} bactéries par gramme de contenu (4). L'utilisation d'outils moléculaires a montré que la plus grande partie (deux tiers environ) des espèces dominantes observées dans le microbiote fécal d'un individu lui est propre (4).

1.2. Stabilité – Résilience :

Si l'on reconnaît ainsi des caractéristiques très conservées en terme de composition au niveau des phyla et grands groupes phylogénétiques, au niveau des espèces, le microbiote d'un individu lui est propre. Une fois le microbiote adulte mis en place, et si les conditions environnementales ne changent pas, la composition en grands groupes bactériens et en espèces dominantes est stable dans le temps. Ainsi si on réalise une électrophorèse particulière du génome bactérien à partir d'une selle d'un individu, on observe pour chaque individu un 'code barre' unique hautement stable dans le temps (2). Cette notion de stabilité dans le temps du microbiote est nouvelle et fondamentale, rapprochant le microbiote d'une entité structurée et fonctionnelle qui en font un véritable 'organe caché'.

En revanche, les populations sous dominantes, minoritaires, peuvent varier (5). Des facteurs environnementaux peuvent induire des changements majeurs. C'est le cas de prises d'antibiotiques, de changement dans le régime alimentaire ou encore au décours d'une infection intestinale (6). Après une perturbation de cet écosystème, le retour à l'équilibre antérieur ou vers un nouvel équilibre est une caractéristique importante à connaître. Ce phénomène est appelé résilience du microbiote intestinal. Il s'agit de la mise en route de phénomènes dynamiques écologiques peu connus qui restore le microbiote après perturbation. Ceci est bien évidemment à prendre en compte lorsque l'on envisage de pouvoir moduler le microbiote dans un but thérapeutique. La vitesse de retour à l'état antérieur ou vers un nouvel état stable est un élément mal connu et évalué à quelques semaines ou mois après une prise d'antibiotique (6). La résilience du microbiote intestinal reste un sujet de recherche majeur qui est à l'étude notamment lors des approches de transplantation de microbiote fécale qui commencent à être pratiquées.

2. Structure et description classique et moléculaire

Le microbiote intestinal est donc composé de 10^{14} micro-organismes répartis en 160 espèces bactériennes chez un individu parmi le millier d'espèces identifiées dans les cohortes humaines étudiées. Comme il l'a été mentionné précédemment, ces 10^{14} bactéries sont majoritairement réparties en 4 phyla bactériens: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, et *Proteobacteria*. Les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* constituent les deux phyla dominants du microbiote avec une représentativité respective de 60-75% et 30-40%. Comme dans tout écosystème bactérien, plus de 90% des espèces du microbiote intestinal ne sont pas

cultivables. Vivant dans la plupart des cas en absence d'oxygène, dans un environnement dont les propriétés physico-chimiques sont souvent difficiles à caractériser et à reproduire, ces bactéries intestinales ne peuvent pas être cultivées en laboratoire. Des approches culture-indépendantes basées sur le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S, par exemple, ont été développées afin d'appréhender la grande diversité du microbiote intestinal. Deux types d'échantillons peuvent être analysés afin d'accéder aux espèces bactériennes composant l'écosystème intestinal : en effet les populations bactériennes liées à la muqueuse et celles contenues dans la lumière intestinale doivent être distinguées. Elles présentent des fonctions et une composition bien différentes. Le biofilm composant le microbiote muqueux à la surface de l'épithélium intestinal possède des fonctions métaboliques particulières de transformation des aliments et d'échange de nutriments ainsi qu'une fonction d'induction et d'éducation du système immunitaire de l'hôte. Le microbiote issu d'échantillons fécaux est le plus souvent étudié en raison de la facilité de collecte des échantillons. Même si l'importance des différences dans la composition et le rôle du microbiote fécal vs le microbiote muqueux est reconnue, elle demeure à ce jour mal évaluée.

Une étude publiée en 2005 dans la revue Science par une équipe américaine de l'Université de Stanford décrit le microbiote intestinal muqueux et fécal d'individus sains (1). Ces auteurs ont obtenu 11831 séquences codant l'ARNr16S bactériens et 1524 séquences codant le gène du 16S présent chez les Archées. L'analyse phylogénétique de l'ensemble de ces séquences a permis l'identification de 395 phylotypes bactériens et d'un seul phylotype d'archaea correspondant à *Methanobrevibacter smithii*. Sur les 395 phylotypes, 301 correspondent à des Firmicutes et 95% de ces séquences appartiennent à des bactéries du groupe Clostridia. Certaines de ces séquences (42), correspondent à des bactéries produisant du butyrate et appartenant aux clusters IV, XIVa et XVI de ce groupe Clostridia. Parmi les 65 séquences correspondant à des Bacteroidetes, de plus grandes variations ont été observées entre les individus. Dans ce phylum, *Bacteroidetes thetaiotaomicron* a été retrouvé chez tous les individus. Ensuite, quelques séquences seulement correspondant aux *Proteobacteria*, aux *Actinobacteria*, aux *Fusobacteria* et aux *Verrucomicrobia* ont été identifiées.

En raison d'une diminution des coûts du séquençage haut-débit de l'ADN et de l'amélioration des outils d'analyse bio-informatique, il est aujourd'hui possible de comparer la composition des communautés bactérienne du tractus digestif d'un grand nombre de sujets : enfant, adulte, personne âgé, patients obèses, patients atteints de maladies inflammatoires

chroniques de l'intestin, etc...). L'analyse de l'ensemble des génomes bactériens présent dans un écosystème donné est appelée analyse métagénomique. De grands programmes d'analyse du métagénome intestinal humain ont été entrepris ces dernières années (MetaHIT) (7). Dans ce programme MetaHIT, l'analyse de 396 échantillons de selles a permis d'obtenir un catalogue de 3,9 millions de gènes répartis dans 7381 groupes de co-abondance de gènes. Environ 10% de ces groupes correspondent à des bactéries (plus des $\frac{3}{4}$ de ces bactéries n'ayant jamais été référencées dans les bases de données). Les 90% restants correspondent à des groupes de virus bactériens (bactériophages), de plasmides (fragments d'ADN bactériens circulaires) ou encore des gènes qui protègent les bactéries d'attaques virales (connus sous le nom de séquences CRISPR)(7).

Selon un séquençage du métagénome, c'est-à-dire de l'ensemble des gènes appartenant à ces bactéries, réalisé à partir de selles collectées auprès de 124 européens en 2009, il y aurait de 1000 à 1150 espèces bactériennes différentes dans le microbiote intestinal. Chaque individu hébergerait environ 160 de ces espèces (8). Comme attendu, parmi les espèces prédominantes du microbiote les auteurs ont trouvé des représentants des phyla *Firmicutes* (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium leptum*, *Enterococcus faecalis*, *Roseburia intestinalis*...) et *Bacteroidetes* (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*...), des groupes *Dorea/Eubacterium/Ruminococcus* (*Dorea longicatena*, *Ruminococcus torque*, *Eubacterium hallii*...). Ont également été identifiés des espèces de *Bifidobacteria*, *Proteobacteria* et des représentants du groupe *Streptococci/Lactobacilli* (*Streptococcus thermophilus*...). Au-delà de l'identification des espèces bactériennes présentes dans l'écosystème intestinal en condition de normobiose, ces analyses métagénomiques, permettent également de caractériser les modifications de la composition et les modifications fonctionnelles du microbiote intestinal. Les rôles qu'exerce cette entité sont majeurs pour la physiologie et doivent être portés à notre connaissance afin de pouvoir moduler certaines fonctions physiologiques en modulant le microbiote et/ou appréhender les conséquences fonctionnelles de modifications du microbiote.

3. Fonctions métaboliques et immunitaires

La présence permanente d'une importante biomasse bactérienne exerce des effets physiologiques dont les répercussions pour l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques. Le

microbiote intestinal contribue, d'un point de vue métabolique, à la fermentation des sucres et des protéines et au métabolisme de nombreuses molécules tels que les acides biliaires et les xénobiotiques. Le microbiote participe également à la maturation du système immunitaire et joue un véritable rôle de barrière protectrice de l'épithélium intestinal contre l'infection par des micro-organismes pathogènes.

3.1. Fonctions métaboliques

Les principales sources d'énergie du microbiote sont les glucides et les protéines contenues dans les fibres alimentaires qui ne sont pas digérées par l'hôte dans le tractus digestif supérieur et qui parviennent alors dans le côlon. La nature et la quantité des substrats disponibles dépendent donc des individus et de leur régime alimentaire qui constitue un facteur environnemental susceptible d'influencer l'équilibre du microbiote comme cela a été mentionné précédemment. La biotransformation de ces différents substrats par le microbiote colique d'une part permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et d'autre part génère la production d'une diversité de métabolites qui sont pour la plupart absorbés et utilisés par l'hôte.

3.1.1. Métabolisme des glucides :

Selon les individus et leur régime alimentaire, 10 à 60 g de glucides fermentescibles par jour parviennent au côlon. Différents groupes bactériens du microbiote colique avec des activités complémentaires participent à la dégradation anaérobie des polymères glucidiques en métabolites fermentaires et forment ainsi une chaîne trophique. La première étape de cette chaîne est la dégradation des différents polymères en fragments plus petits (oligosides, oses...) fait intervenir une grande variété d'hydrolases (polysaccharidase, glycosidases...). Ces enzymes ne sont pas produites par les cellules eucaryotes humaines mais par les bactéries du microbiote colique dites « fibrolytiques ». Ces bactéries appartiennent principalement aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia*. Les bactéries glycolytiques transforment les glucides ainsi produits en pyruvate en utilisant la glycolyse. Le pyruvate est lui-même transformé *via* différentes voies métaboliques en produits finaux de la fermentation, les acides gras à chaîne courte. Il s'agit de l'acétate produit par la majorité des espèces prédominantes du côlon (*Bacteroides*, *Clostridium*...), du propionate synthétisé principalement par les espèces du genre *Bacteroides* et également par *Propionibacterium* et *Veillonella* et enfin du butyrate produit par les espèces des genres *Eubacterium*, *Coprococcus*,

Roseburia, *Faecalibacterium* (9). Cependant, un certain nombre d'espèces bactériennes (des genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*...) produisent des métabolites intermédiaires (succinate, lactate, éthanol, formate) qui sont ensuite transformés par d'autres espèces bactériennes en produits finaux.

3.1.2. Métabolisme des gaz :

L'hydrogène est le gaz majoritairement produit lors des processus fermentaires, et ce en grande quantité de façon quotidienne dans le côlon. Son élimination, essentielle à l'efficacité du processus fermentaire, est possible de plusieurs manières. Il peut être excrété par l'émission de gaz rectaux ou par voie pulmonaire, mais la plus grande partie de l'hydrogène est transformée *in situ* par des bactéries du microbiote colique dites hydrogénotrophes (10). Les trois types de transformation principaux sont : en méthane par les archaea méthanogènes (présents dans le microbiote colique de 30 à 50% des adultes), en acétate par les bactéries acétogènes, et enfin en sulfures au potentiel délétère pour le colonocyte par les bactéries sulfato-réductrices (dont le genre prédominant est *Desulfovibrio*).

3.1.3. Métabolisme des protéines :

La biodégradation des protéines par le microbiote colique est quantitativement moins importante que celle des glucides mais elle est fondamentale car les protéines représentent la principale source azotée pour les bactéries coliques. Par ailleurs, le métabolisme des protéines fait intervenir plusieurs espèces ayant des activités complémentaires. Les bactéries dites « protéolytiques », appartenant aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*, sont capables par leur activité protéasique d'hydrolyser les protéines en petits peptides. Elles disposent ainsi de l'azote et du carbone qui leur sont nécessaires. Certaines espèces bactériennes peuvent assimiler directement ces peptides. Cela s'accompagne fréquemment de la libération d'acides aminés libres qui seront utilisés par d'autres bactéries incapables d'assimiler des peptides. Chez certaines espèces (des genres *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Clostridium*...) ne fermentant pas les glucides, les acides aminés sont utilisés comme source principale d'énergie. La fermentation des acides aminés par les bactéries du microbiote colique utilise plusieurs réactions d'oxydation et de réduction dont la principale est la voie réductrice de désamination. Elle aboutit à la formation d'acides gras à chaînes courtes (acétate, propionate, butyrate) et d'ammoniac. Néanmoins, de nombreux autres composés comme des phénols, des acides di-carboxyliques et des acides gras

ramifiés (isobutyrate, isovalerate ...) sont également produits lors du métabolisme des acides aminés. Les composés phénoliques et indoliques, issus de la dégradation des acides aminés aromatiques et qui sont potentiellement toxiques pour l'hôte sont absorbés et détoxifiés dans la muqueuse colique, puis excrétés dans les urines. L'ammoniac est également absorbé dans le côlon, il rejoint le foie par la circulation portale où il est converti en urée qui sera éliminée par voie urinaire. L'ammoniac est aussi une source majeure d'azote pour un grand nombre de bactéries du microbiote colique qui l'utilise pour la synthèse d'acides aminés grâce à leur activité amino-transférase.

3.1.4. Métabolisme des lipides :

Les lipides de la lumière colique proviennent de trois origines : les lipides non absorbés dans l'intestin grêle, ceux provenant de la désquamation des colonocytes et les lipides bactériens. Ces acides gras sont transformés (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation...) par les bactéries du microbiote colique. Le cholestérol colique, qui provient pour la majorité de la bile (70%) et pour le reste de l'alimentation (20%) et de la désquamation des cellules épithéliales intestinales (10%), est converti par le microbiote en coprostanol qui n'est pas absorbé et donc est éliminé dans les fèces (11). Cette efficacité est très variable d'un sujet à l'autre et le taux fécal de coprostanol pourrait être impliqué dans la réduction du risque cardio-vasculaire et la cancérogénèse colique. Les acides biliaires, produit de transformation du cholestérol par le foie, sont également conjugués à la glycine ou à la taurine, ce qui a pour conséquence une amphiphilie accrue. Quatre-vingt quinze pour cent des acides biliaires suivent le cycle entéro-hépatique : sécrétion biliaire, réabsorption au niveau de l'iléon terminal, retour au foie via le système porte, avant d'être à nouveau sécrété dans la bile. Seuls 5% des acides biliaires sécrétés dans la bile parviennent donc au côlon où ils sont métabolisés (déconjugaison, oxydation, épimérisation, 7 alpha-déshydroxylation, désulfatation...) par les bactéries du microbiote en acides biliaires dits secondaires (12). La déconjugaison (espèces des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*...) rend les acides biliaires plus hydrophobes et favorise leur absorption passive. Les acides cholique et chénodésoxycholique, acides biliaires primaires principaux chez l'homme, sont transformés par 7 alpha-déshydroxylation par les espèces du genre *Clostridium* en acides desoxycholique et lithocholique (acides biliaires secondaires) qui pourraient avoir un effet carcinogène sur la muqueuse colique. Les hormones stéroïdes et des xénobiotiques suivent également un cycle

entéro-hépatique et les mêmes voies métaboliques avec conjugaison hépatique et déconjugaison par le microbiote colique.

3.2.Effet barrière et fonctions immunitaires :

L'effet barrière est un effet protecteur du microbiote intestinal vis-à-vis des bactéries pathogènes exogènes. En effet il existe une compétition pour les nutriments et les sites d'adhérence épithéliaux entre pathogènes et les bactéries commensales. Par ailleurs le microbiote est capable de produire des bactériocines et de stimuler la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales. Il induit également la production des IgA sécrétoires et favorise le bon fonctionnement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales(13), ce qui diminue l'invasion par des bactéries pathogènes. Outre ses propriétés de barrière, le microbiote intestinal joue un rôle fondamental dans le développement et la maturation du système immunitaire. La découverte de cette fonction essentielle du microbiote vient de l'observation des différences entre souris axéniques (élevés en milieu stériles et donc dépourvues de microbiote intestinale) et souris élevées en animalerie classique dans le cadre d'études comparatives (14). Les souris axéniques présentaient de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal : hypoplasie des plaques de Peyer, diminution des lymphocytes intra épithéliaux, déficit en certaines populations lymphocytaires T, diminution de sécrétion intestinale d'immunoglobulines A, concentration d'immunoglobulines sériques et production de cytokines limitées. Mais ces anomalies ne se limitaient pas à l'épithélium intestinal, puisque l'observation de la rate et des ganglions lymphatiques révélait l'absence de structure avec des zones lymphocytaires atrophiées. Par ailleurs, l'ensemble des ces anomalies disparaissaient quelques semaines après l'inoculation du microbiote de souris conventionnelle à ces souris axéniques. A coté de ces observations sur les fonctions globales du microbiote, il semble que certaines espèces bactériennes aient des propriétés spécifiques. L'homéostasie intestinale est notamment sous la dépendance d'un équilibre entre les lymphocytes T

effecteurs (Th17 principalement) et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Il a récemment été montré que certaines bactéries stimulent particulièrement les populations Th17 intestinales (15) alors que d'autres stimulent les Treg (16) par l'intermédiaire des acides gras à chaînes courtes qu'elles produisent (17). Elles participent ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale.

Conclusions :

Le microbiote intestinal humain contient, entre autres micro-organismes, environ 10^{14} bactéries et représente l'un des écosystèmes les plus complexes présents à la surface de la terre. Cette entité forme une biomasse extrêmement biodiverse, unique pour chaque individu, relativement stable dans le temps, capable de résilience et dont la structure est en bien définie à l'échelle des phyla des grands groupes. Plus de 90% des espèces du microbiote intestinal ne sont pas cultivables en laboratoire et il a fallu attendre l'avènement de méthodes indépendantes de la culture pour mieux caractériser la diversité du microbiote intestinal. Au-delà de l'identification des espèces, des analyses métagénomiques, permettent également de d'évaluer les modifications fonctionnelles du microbiote intestinal. Les fonctions qu'exerce le microbiote sont majeures pour la physiologie contribuant d'une part, d'un point de vue métabolique, à la fermentation des sucres et des protéines et au métabolisme de nombreuses molécules (acides biliaires et les xénobiotiques) mais aussi participant à la maturation du système immunitaire et jouant un véritable rôle de barrière protectrice de l'épithélium intestinal contre l'infection par des micro-organismes pathogènes. Ces fonctions doivent faire l'objet de notre attention si l'on veut à terme pouvoir moduler certaines fonctions physiologiques en modulant le microbiote et/ou appréhender les conséquences fonctionnelles de modifications du microbiote.

Références :

1. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8. Epub 2005/04/16.
2. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 2003;52(2):237-42. Epub 2003/01/14.
3. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;51(1):77-84. Epub 2010/05/19.

4. Tyler AD, Smith MI, Silverberg MS. Analyzing the human microbiome: a "how to" guide for physicians. *The American journal of gastroenterology*. 2014;109(7):983-93. Epub 2014/04/23.
5. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome biology*. 2011;12(5):R50. Epub 2011/06/01.
6. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4554-61. Epub 2010/09/18.
7. Nielsen HB, Almeida M, Juncker AS, Rasmussen S, Li J, Sunagawa S, et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature biotechnology*. 2014;32(8):822-8. Epub 2014/07/07.
8. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65. Epub 2010/03/06.
9. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS microbiology letters*. 2002;217(2):133-9. Epub 2002/12/14.
10. Christl SU, Murgatroyd PR, Gibson GR, Cummings JH. Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology*. 1992;102(4 Pt 1):1269-77. Epub 1992/04/01.
11. Lichtenstein AH. Intestinal cholesterol metabolism. *Annals of medicine*. 1990;22(1):49-52. Epub 1990/02/01.
12. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research*. 2006;47(2):241-59. Epub 2005/11/22.
13. Hooper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in microbiology*. 2004;12(3):129-34. Epub 2004/03/06.
14. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(6):478-85. Epub 2004/06/03.
15. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*. 2009;31(4):677-89. Epub 2009/10/17.
16. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011;331(6015):337-41. Epub 2011/01/06.
17. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-73. Epub 2013/07/06.

Understanding Microbiome Data: A Primer for Clinicians

Philippe Seksik Cécilia Landman

Sorbonne Universités-UPMC Univ Paris 06, INSERM ERL 1157, AP-HP, Hôpital Saint Antoine, CNRS UMR 7203 LBM,
CHU Saint-Antoine, Paris, France

Key Words

Microbiome · Dysbiosis · 16S rRNA · Metagenome ·
Inflammatory bowel disease

Abstract

The human gut contains 10^{14} bacteria and many other micro-organisms such as Archaea, viruses and fungi. This gut microbiota has co-evolved with host determinants through symbiotic and co-dependent relationships. Bacteria, which represent 10 times the number of human cells, form the most depicted part of this black box owing to new tools. Re-evaluating the gut microbiota showed how this entity participates in gut physiology and beyond this in human health. Studying and handling this real 'hidden organ' remains a challenge for clinicians. In this review, we aimed to bring information about gut microbiota, its structure, its roles and the way to capture and measure it. After bacterial colonization in infant, intestinal microbial composition is unique for each individual although more than 95% can be assigned to 4 major phyla. Besides its biodiversity, the major characteristics of gut microbiota are stability over time and resilience after perturbation. In pathological situations, dysbiosis (i.e. imbalance in gut microbiota composition) is observed with a loss in overall diversity. Dysbiosis associated with inflammatory bowel disease was specified with the reduction in biodiversity, the decreased representation of different taxa in the Firmicutes phylum and an increase in Gammaproteobacteria. Beyond depicting gut microbial composition,

metagenomics allows the description of the combined genomes of the microorganisms present in the gut, giving access to their potential functions. In fact, each individual overall microbial metagenome outnumbers the size of human genome by a factor of 150. Besides a functional core in which there is redundancy for mandatory functions assuring the robustness of the ecosystem, human gut contains an important diversity and high number of non-redundant bacterial genes. Clinical data, treatment and all the factors able to influence microbiome should enter integrated big data sets to put in light pathways of interplay within the supra organism composed of gut microbiome and host. A better understanding of dynamics within human gut microbiota and microbes-host interaction will allow new insight into gut pathophysiology especially regarding resilience mechanisms and dysbiosis onset and maintenance. This will lead to description of biomarkers of diseases, development of new probiotics/prebiotics and new therapies.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Microbial communities are ubiquitous, highly diverse and perform key metabolic functions that shape ecosystems and insure their stability. Microbial ecology theory and approaches have provided invaluable insight into the complex interactions occurring between an individual and his trillions of microbial partners, with promising implications for personalized therapies. International sequencing efforts such as MetaHIT and the human micro-

biome project (HMP) have demonstrated that the gut microbiota contributes to host nutrition, modulates the host's immune system, metabolizes and modifies xenobiotics (compounds foreign to a living organism, including therapeutic drugs) and can protect against pathogens [1–4]. This re-evaluation of the gut microbiota that is central for our health has led to a surge of studies exploring the impact of diet, antibiotics and probiotics, thus paving the way for the development of personalized therapeutic treatments. Understanding gut microbiome is thus a challenge for all the actors involved into this field and especially for clinicians taking care of inflammatory bowel disease (IBD) patients.

From Gut Ecosystem to Dysbiosis

Gut microbiota must be considered a part of a complex ecosystem including all the microorganisms within the gut, host landscape (host cells, mucus, physicochemical conditions, secretory IgA, anti-microbial peptides, luminal compounds in transit, etc.) and interactions between all of these actors. Interactions between microorganisms are beginning to be depicted through predator-prey models [5] and/or context-dependent competition [6]. Co-evolution of microorganisms and host provide a beneficial symbiotic relationship; thus, besides the biotic interactions that influence community dynamics, symbiotic events occur between microorganisms and host determinants shaping the microbial community as well as the local conditions [7, 8]. Ecological theory is thus essential in understanding gut microbiome systems. Complex community assemblage in which numerous microorganisms share a defined ecological niche ensures renewal of the microorganism populations. Co-dependency and trophic chains lead to metabolic support from additional members of the community for survival [9, 10].

Leaving the whole ecosystem and focusing on gut microbiota, one should thus recall that it involves not only bacteria, virus and particularly phages [5, 11] but also fungi and Archaea [12, 13]. Most of all, these microorganisms require extreme and commonly non-reproducible culture conditions. This characteristic prevents the collection of all microbiota information, unless it is to overcome culture difficulties using culture-independent methods [14]. Moreover, most of the knowledge about gut microbiota comes from the bacterial component of the gut microbiota, and in this paper, we will go through microbiome information centered on bacterial data.

To start with the very beginning, at birth, all the mammals (and thus humans) exhibit a sterile digestive tract. Bacterial colonization of the infant gut starts at birth and is influenced by feeding habits (formula vs. breast feeding), birth mode and antibiotic exposure [15, 16]. The intestinal microbiota of full-term vaginally delivered breast-fed infants is considered the gold standard, representing the reference for studies of alterations in other pediatric populations. At 2–3 years of age, the intestinal microbiota reaches a composition similar to that of adults, remaining without noticeable variations until senescence. 'Adult' gut microbiota co-exists within the host in increasing concentration from the stomach to the distal part of the gut reaching an upper level in the colon having 10^{11} – 10^{13} bacteria/g of luminal contents [17]. Each individual harbors a unique collection of 10^{14} bacterial strains and species in the gut, although >95% of them can be assigned to 4 major phyla: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Proteobacteria [18]. The amount of bacteria in the human gut outnumbers human cells by a factor of 10, but some finely tuned mechanisms allow these microorganisms to colonize and survive within the host in a mutual relationship. The microbiota provides crucial functions that humans cannot exert themselves while the human host provides a nutrient-rich environment. Chaotic in the early stages of life, the assembly of the human gut microbiota remains globally stable over time in healthy conditions and in the absence of perturbation. Following perturbation, such as antibiotic treatment, bacteria will recolonize the niches with a composition and diversity similar to the basal level since the ecosystem is highly resilient. Recurrent perturbations could lead to a decrease in resilience capacity of the gut microbiome.

Considering gut microbiota characteristics such as its high biodiversity, stability over time, resilience capacity and symbiotic interplay with host, one can see gut microbiota as a hidden organ that exerts physiological functions [19]. The 2 major areas of function involved in this setting are the metabolic pathways and immune defense. Regarding the metabolic functions, gut microbiota is able to digest substrates inaccessible to host enzymes and to control fat storage [20], and alterations in gut microbiota could influence diabetes and/or a series of metabolic diseases. Besides, gut microbiota plays a fundamental role in the induction, training and function of the host immune system [21]. In return, the immune system has largely evolved as a means to maintain the symbiotic relationship of the host with these highly diverse and evolving microbes. When operating optimally, this immune system-microbiota alliance allows the induction of protective re-

sponses to pathogens and the maintenance of regulatory pathways involved in the maintenance of tolerance to innocuous antigens. However, in high-income countries, overuse of antibiotics, changes in diet and elimination of constitutive partners, such as nematodes, may have selected for a microbiota that lack the resilience and diversity required to establish balanced immune responses. The human gut microbiota is exposed daily to various types of perturbations, several of which can result in significant alterations of the community and lead to dysbiosis (i.e. a disruption of the ecosystem equilibrium) [1, 22]. This state of disequilibrium is characterized by a loss of overall microbial diversity and the expansion of bacteria generally kept at low levels in the healthy gut, which can result from a variety of different human pathologies including IBDs. IBD-associated intestinal dysbiosis is a particular case of intestinal dysbiosis, where the alterations in the community structure of the gut microbiota also correlates with a deregulated immune response of the host, leading to severe and chronic inflammation of the gut. Thus, gut microbiota must be considered as a dynamic biomass, responsive to perturbations, that shows an altered structure called dysbiosis in individuals with intestinal diseases [23–25]. In this setting, the conceptual toolbox for describing microbial community is required to understand microbiome data and will be detailed below.

From Identification of Bacteria to Microbiome Functional Studies

Composition of the Gut Microbiota

Rapid development of sequencing technologies including high throughput facilities firstly allowed the depiction of alterations in the composition of the gut microbiota in a defined ecosystem. The most studied compartment in this field remains fecal microbiota but data coming from mucosa-associated bacterial community by examining biopsies or surgical specimens are also available. Sampling, storage, extraction, sequencing and assignment need to be correctly performed in order to obtain good quality data. One may recall that storage at -80°C immediately offers the best way to wait before extraction. Bacterial DNA/RNA extraction methods have an important influence on the downstream results, and as far as no protocol prevent bias, it is recommended to combine chemical to mechanical lysis in order not to overevaluate a population of bacteria with different cell wall qualities [26]. To assess bacterial community structure

avoiding culture methods, molecular tools have been developed based on genes encoding 16S ribosomal RNA subunits. In fact, these genes are considered as semantide molecules, as accumulating mutations reflect the evolution of species. In the last decade, we learned about microbial communities, their diversity and correlation with diseases. Methods based on 16S rRNA sequencing (Illumina or 454 pyrosequencing) is confined to analyzing bacterial composition and distribution in a specific community [27]. Following sequencing, quality filtering removes sequences with low base quality score, short reads and chimeric sequences [28]. Before statistical analysis, sequence identification or assignment must be performed by direct assignment of sequences to phylotype (depending on referent database) or by operational taxonomic unit (OTU)-based processing [29]. For OTU analysis, sequences that are 97% similar can be considered as the same species. Although a database based on most of the species detected by 16S rRNA has been established, technical limitations in identifying bacteria prevents analysis at the species level. Additionally, 16S rRNA-based PCR as a technique limits the analysis of communities solely to the identification of bacteria. Besides, analysis of data sets gives the usual ecological indicator of composition such as absolute and relative abundance (numbers of OTU or phylotypes), coverage also called sequencing depth (number of sequences obtained per sample in a sequencing run) and estimates of alpha and beta diversity. Alpha corresponds to the richness within one sample (using Shannon or Simpson diversity index), and beta diversity is related to diversity between samples and is often displayed as a principal component analysis. These methods allow the simplistic visualization of data sets and measurement of the strength of patterns to assess significance.

All these 16S rRNA-based techniques lead to the description of alterations of the gut microbiota composition in IBDs, and a broad pattern has begun to emerge that includes reduction in biodiversity, a decreased representation of several taxa within the Firmicutes phylum and an increase in Gammaproteobacteria. These alterations or dysbiosis of the bacterial community reinforced the view that IBD results from altered interactions between gut microbiota and the mucosal immune system.

The Gut Microbiome

Further insights into the human gut ecosystem are needed to comprehend the exact role of microbiota in health and disease. Knowing which microbes are there is not sufficient. Essential questions remain unaddressed regarding the genetic potential of the non-cultured bacte-

rial fraction of the gut microbiota, the functions that really occur within the gut. Meta-omics aims at answering these questions. Metagenomics, defined as analysis of the collective genomes that are present in a defined environment or ecosystem, has started to put forward the microbial functionalities embedded into the human gut microbiota. A new method that has received considerable attention, named short-gun sequencing, sequences DNA directly, allowing the microorganisms other than bacteria to be identified. This method can directly analyze the bacterial protein-encoding region from the acquired DNA and analyze the genus level, with results depending on sequencing depth and complexity of the communities. This method requires an expensive and sophisticated computer program that can handle large data sets, requiring technical expertise [30, 31]. Evidence for co-evolution and the high level of complexity of humans and their microbiome has led to the hypothesis of functional redundancy in the intestinal microbiome. Different bacterial species share functional traits and the large amount of intestinal bacteria guarantees the presence of all mandatory functions, providing robustness to this ecosystem. The first extensive catalogue of microbial genes from the human gut, published by Qin et al. [32], described the large variety of traits provided by the intestinal microbiota and an overall metagenome per individual outnumbering by a factor of 150 the size of the human genome. This catalogue highlighted the existence of a functional core, conserved in each individual of the cohort. In the studied population, 38% of one individual's bacterial genes were shared by at least 50% of the cohort, highlighting a high level of functional similarities between individuals. This percentage fell to 9% when looking at genes shared by at least 80% of the community. Studies from the MetaHIT programme led to an important breakthrough about functional gut microbiome impairment in inflammation-related diseases, particularly in IBD. Remarkably, the number of non-redundant bacterial genes was significantly lower in patients with IBD than in healthy individuals and functional genes or modules, thus strongly correlating with an individual's clinical status. Such a functional microbial dysbiosis in IBD context may affect the host-microbiota crosstalk at the mucosal interfaces. While 16S rDNA-sequencing-based and metagenomics studies have extensively described the community structure of the gut microbiota, its gene content (microbiome) and its dynamics in IBD-associated dysbiosis, inferring microbial activity from these sequence-based studies is challenging, and we have no clear mechanistic understanding of the role of the gut microbiota in this pathol-

ogy. The key active microbial species, metabolic pathways involved, and molecules produced are still largely unknown. After assessing the functional capacity of the intestinal microbiota, the next level is to assess the actual functions exerted by the microbiota. One way to do so is by analyzing the mRNA sequences from the microbiota, the metatranscriptome. However, understanding the fine structure, dynamics and overall impact of a microbial ecosystem requires probably the combination of these 2 approaches [33]. The links between bacterial community structure and metabolic activity remain unclear, as these sequence-based studies identify the metabolic potential of these cells and not their *in situ* activities. Studies linking bacterial activity and identity are thus essential to identify the active component of the gut microbiota and its response to clinically relevant stressors such as therapeutic drugs.

The specific impact of different sampling and nucleic acid extraction methods on metagenomics and also meta-omics data is currently assessed within the European funded project, International Human Microbiome Standards (IHMS; <http://www.microbiome-standards.org/>). The main goal of the IHMS is to harmonize practices and facilitate data comparison among projects worldwide. Because mRNA stability is low, microbial gene expression is better captured if sampled physically close to the expression site. However, to compare the transcriptome of bacteria at different intestinal sites (luminal, adherent and mucosal), a protocol uniformly efficient on different types of material (feces, biopsies and mucus) is mandatory, and to our knowledge, no satisfactory protocol for bacterial RNA extraction from each of these different matrices has been published so far. Knowing exactly which proteins and metabolites are active will broaden our knowledge of the intestinal ecosystem. Future challenges for a better understanding of human biology would be clearly related to an integrative perception of our gut microbiome obtained from the meta-omics application.

Future Directions

Biomarkers and Cognitive Concerns

Future directions on research about gut microbiome will involve both biomarkers search and insight into gut pathophysiology. In this setting, sampling is not a trivial point when designing future studies. The potential to develop new microbial diagnostic markers of the human clinical status, to provide early disease diagnostic techniques and new therapeutic strategies, or to maximize the

contribution of our microorganisms or probiotics has spawned many HMPs. However, until now, functions encoded by numerous microbial genes found predominant in healthy individuals while missing in patients with disease have so far not been identified. New experimental and computational tools will facilitate the discovery of impaired pathways to be specifically targeted at larger cohorts using the 'omic' technologies. If fecal sample analysis as a surrogate for the entire gut microbiota is necessary for large cohort screening and specific biomarker detection, determining the mechanisms will require the meta-omics description of the mucosal microbiota. Recently, Wang et al. [34] showed that, from the metagenome associated with the right and left colonic mucosa, functional diversity was comparable to that reported in feces, with an overall functionality mainly supported by genes associated with carbohydrate, protein and nucleic acid utilization.

Integrated Database

Dynamics within gut microbiota need to be more investigated. Regulation of the population of microorganisms within the gut is beginning to be studied [5]. Inter-bacterial communication, change in luminal content, bacterial products, phages cycles and their contribution to this inter-kingdom interplay represent new challenges to understand the complexity of the regulation of the so-called hidden organ. This new science will be able to explain dysbiosis and resilience mechanisms more deeply and to better manipulate gut microbiota in a therapeutic perspective. Moreover, co-sequencing and direct interfac-

ing of human and microbiome genomes is now feasible and, while computationally challenging, it should uncover a new link between human-microbes co-evolution and pathways disturbance in disease conditions. More and more evidence from animal studies shows a genetic effect on microbiome composition (especially with regard to innate immunity-related mutations) [35–37]. In human studies, unaffected relatives of patients with IBD also show subclinical microbial dysbiosis [38]. However, the genetic and environmental risk factors they share with their diseased relatives seem to be counterbalanced. Metagenomic analysis of unaffected relatives will be important to answer the recurrent question of whether the dysbiosis is the 'cause or consequence' of the disease. Finally, clinical data, treatment and all the factors able to influence microbiome expression and interactions should enter in an integrated database in order to provide big data sets. All this information thus needs to be analyzed using new statistic/mathematic tools and algorithms able to put in light pathways of interplay within the supra-organism composed of gut microbiome and host physiology.

Source of Support

None.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Human Microbiome Project Consortium: Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486:207–214.
- Haiser HJ, Turnbaugh PJ: Is it time for a metagenomic basis of therapeutics? *Science* 2012;336:1253–1255.
- Maurice CF, Turnbaugh PJ: The human microbiome: exploring and manipulating our microbial selves; in Marco D (ed): *Metagenomics: Current Innovations and Future Trends*. Norfolk, UK, Caister Academic Press, 2011.
- Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al: Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;326:1694–1697.
- Reyes A, Wu M, McNulty NP, et al: Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:20236–20241.
- de Muinck EJ, Stenseth NC, Sachse D, et al: Context-dependent competition in a model gut bacterial community. *PLoS One* 2013; 8:e67210.
- Martins dos Santos V, Müller M, de Vos WM: Systems biology of the gut: the interplay of food, microbiota and host at the mucosal interface. *Curr Opin Biotechnol* 2010;21:539–550.
- Jakobsson HE, Rodríguez-Piñero AM, Schütte A, et al: The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep* 2015;16:164–177.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, et al: Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291:881–884.
- Lozupone C, Faust K, Raes J, et al: Identifying genomic and metabolic features that can underlie early successional and opportunistic lifestyles of human gut symbionts. *Genome Res* 2012;22:1974–1984.
- Dutilh BE, Cassman N, McNair K, et al: A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun* 2014;5:4498.
- Mukhopadhyaya I, Hansen R, Meharg C, et al: The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect* 2015;17:304–310.
- Blais Lecours P, Marsolais D, Cormier Y, et al: Increased prevalence of *Methanosphaera stadtmanae* in inflammatory bowel diseases. *PLoS One* 2014;9:e87734.
- Sokol H, Seksik P: The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26:327–331.
- Fallani M, Young D, Scott J, et al: Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51:77–84.

- 16 Salazar N, Arbolea S, Valdés L, et al: The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Front Genet* 2014;5:406.
- 17 Dave M, Higgins PD, Middha S, et al: The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res* 2012;160:246–257.
- 18 Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635–1638.
- 19 Shanahan F: The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:915–931.
- 20 Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11070–11075.
- 21 Belkaid Y, Hand TW: Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 2014;157:121–141.
- 22 Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, et al: Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics* 2011;5:71–86.
- 23 Round JL, Mazmanian SK: The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:313–323.
- 24 Collins SM, Denou E, Verdu EF, et al: The putative role of the intestinal microbiota in the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2009;41:850–853.
- 25 Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al: A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457:480–484.
- 26 Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, et al: Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237–242.
- 27 Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group: Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research. *PLoS One* 2012;7:e39315.
- 28 Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al: UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011;27:2194–2200.
- 29 Schloss PD, Westcott SL: Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:3219–3226.
- 30 Sorek R, Zhu Y, Creevey CJ, et al: Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science* 2007;318:1449–1452.
- 31 Morgan XC, Huttenhower C: Meta'omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology* 2014;146:1437–1448.e1.
- 32 Qin J, Li R, Raes J, et al: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59–65.
- 33 Frias-Lopez J, Shi Y, Tyson GW, et al: Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3805–3810.
- 34 Wang Y, Antonopoulos DA, Zhu X, et al: Laser capture microdissection and metagenomic analysis of intact mucosa-associated microbial communities of human colon. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;88:1333–1342.
- 35 Petnicki-Ocwieja T, Hrnrcir T, Liu YJ, et al: Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15813–15818.
- 36 Rehman A, Sina C, Gavrilo O, et al: Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011;60:1354–1362.
- 37 Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, et al: Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* 2010;141:1135–1145.
- 38 Lepage P, Häslér R, Spehlmann ME, et al: Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;141:227–236.

Résumé

Les N-acyl homosérine lactones sont des molécules du quorum sensing impliquées dans la communication interbactérienne mais elles sont également capables d'interagir avec les cellules eucaryotes. Rechercher ces molécules dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) et plus particulièrement dans le cadre de l'étude des conséquences de la dysbiose sur les voies de l'inflammation intestinale est séduisant. En utilisant la spectrométrie de masse, nous avons mis en évidence pour la première fois des AHLs dans l'écosystème intestinal humain, et plus particulièrement une nouvelle AHL, 3-oxo-C12 :2, qui est prédominante. Cette AHL est corrélée à la normobiose, est perdue au cours des MICI et exerce un effet protecteur sur les cellules épithéliales intestinales. En effet, la 3-oxo-C12 :2 exerce un effet anti-inflammatoire *in vitro* sur les cellules Caco-2 sans augmenter la perméabilité paracellulaire. De plus, les premiers résultats *in vivo* montrent que la 3-oxo-C12 est également capable d'influencer la composition du microbiote intestinal des souris. Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives notamment dans la recherche de traitements écologiques au cours des MICI.

Mots clefs : maladies inflammatoires chroniques intestinales, microbiote intestinale, quorum sensing, N-acyl homosérine lactones, cellules épithéliales, inflammation intestinale

Involvement of N-acyl homoserine lactones, quorum sensing molecules, in inflammatory bowel diseases

Abstract

Quorum sensing molecules N-acyl-homoserine lactones (AHLs) involved in bacterial communication network are also able to interact with eukaryotic cells. Searching for these molecules in the context of inflammatory bowel diseases (IBD) and more precisely when studying consequences of dysbiosis on gut inflammation pathways is appealing. Using mass spectrometry, we identified for the first time AHLs in human intestinal ecosystem, and among them a new AHL, 3-oxo-C12:2 which is prominent. This AHL correlates with normobiosis, is lost IBD and exerts protective effect on gut epithelial cells. In fact, 3-oxo-C12:2 exerts anti-inflammatory effect *in vitro* on Caco-2 cells without increased paracellular permeability. Furthermore, first results from *in vivo* experiments show that 3-oxo-C12:2 is also able to influence mice gut microbiota composition. These results open multiple perspectives especially on new ecological treatments in IBD.

Keywords : inflammatory bowel diseases, gut microbiota, quorum sensing, N-Acyl Homoserine lactones, epithelial cells, gut inflammation