



**HAL**  
open science

# Sélection *in vitro* et *in vivo* de souches probiotiques ayant des propriétés bénéfiques contre l'inflammation, les infections et l'obésité

Jeanne Alard

## ► To cite this version:

Jeanne Alard. Sélection *in vitro* et *in vivo* de souches probiotiques ayant des propriétés bénéfiques contre l'inflammation, les infections et l'obésité. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S014 . tel-03091977

**HAL Id: tel-03091977**

**<https://theses.hal.science/tel-03091977>**

Submitted on 1 Jan 2021

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

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

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

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Lille II**

**Spécialité : Science Biologique**

Présentée et soutenue publiquement par

**Jeanne ALARD**

Le 19 septembre 2017

**Sélection *in vitro* et *in vivo* de souches probiotiques ayant des propriétés bénéfiques contre l'inflammation, les infections et l'obésité**

Thèse CIFRE financée par PiLeJe / ANRT n°2014/0153

Devant le jury composé de :

Madame le Professeur Sophie LESTAVEL	Président
Madame le Professeur Vassilia THEODOROU	Rapporteur
Monsieur le Docteur Hubert VIDAL	Rapporteur
Madame le Docteur Anne-Judith WALLIGORA-DUPRIET	Examineur
Madame le Docteur Christine DELORME	Examineur
Madame le Docteur Corinne GRANGETTE	Directeur de thèse
Monsieur Michel DUBOURDEAUX	Invité

Equipe Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses

Centre d'infection et d'immunité de Lille, CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille –Université de Lille

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, d'avoir accepté de lire et d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie très sincèrement le Professeur Sophie Lestavel d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie également le Professeur Vassilia Theodorou et le Docteur Hubert Vidal d'avoir accepté de rapporter cette thèse. Je remercie de même les Docteurs Anne-Judith Walligora-Dupriet et Christine Delorme d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à adresser des remerciements tout particuliers au Docteur Corinne Grangette, pour m'avoir accueillie il y a 6 ans lors de mon master recherche, offert une chance de continuer en tant qu'ingénieur à ses côtés, puis donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Un très grand merci pour tout.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la société PiLeJe, qui m'a permis, grâce à une aide financière, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse. Je remercie tout particulièrement le Docteur Sophie Holowacz pour son immense disponibilité et son extraordinaire gentillesse et pour cette collaboration si enrichissante.

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

J'adresse également mes remerciements au Docteur Isabelle Wolowzuck. Merci pour tes précieux conseils et échanges scientifiques. J'ai vraiment apprécié de travailler avec toi.

Merci beaucoup à Denise, Véronique, Jérémy et Jérôme, pour toutes les journées passées à l'animalerie (entre autres), pour tous les bons et mauvais moments et surtout de m'avoir supportée. Merci pour votre amitié.

Une petite ligne sans fôte pour la petite qui a eu la patience de relire et corriger toutes les pages.

Enfin un grand merci à tous ceux qui ne sont pas cités ici (au bout de six ans la liste serait malheureusement trop longue), mais que je ne vous oublie pas pour autant.

## RESUME

Des études récentes ont montré que le microbiote participe à l'homéostasie intestinale en contribuant au développement morphologique, à l'éducation du système immunitaire, aux mécanismes de défense de l'hôte et à la régulation du métabolisme. Une dysbiose de ce microbiote ainsi qu'une réduction de la diversité bactérienne ont été observées dans diverses pathologies chroniques telles que les maladies inflammatoires chroniques (MICI) et l'obésité. Le microbiote constitue donc une cible thérapeutique de choix dans la prise en charge de ces maladies chroniques. Les probiotiques, microorganismes bénéfiques pour l'hôte, représentent donc une alternative intéressante, mais dont les critères de sélection nécessitent d'être améliorés.

Dans une première étude, nous avons pu mettre en évidence les propriétés bénéfiques d'un mélange de deux probiotiques comprenant un bifide et un lactobacille dans un modèle murin d'obésité résultant d'une alimentation riche en graisses (Alard *et al*, 2016). Ce mélange probiotique a réduit significativement la prise de poids, a amélioré les paramètres inflammatoires et métaboliques dont l'insulino-résistance, et a augmenté l'expression intestinale des récepteurs aux acides gras à chaîne courte (AGCC). Il a également favorisé dans un système d'intestin artificiel la production de butyrate et propionate ; principaux AGCCs. Les effets protecteurs ont été associés à l'amélioration de la dysbiose du microbiote, notamment la restauration de l'abondance d'*Akkermansia muciniphila*.

L'objectif principal de cette thèse a été ensuite de sélectionner au sein d'une collection de 23 souches bactériennes provenant de la société PiLèJe, une ou plusieurs souche(s) probiotique(s) possédant des propriétés protectrices contre les MICI et l'obésité. Les propriétés immuno-modulatrices des souches ainsi que leur capacité à renforcer la barrière intestinale ont été étudiées *in vitro* à l'aide de cellules mononuclées sanguines humaines, puis dans un modèle *in vitro* de perméabilité membranaire, induite par la sensibilisation d'une monocouche de cellules Caco-2 par de l'eau oxygénée. Six souches ont été sélectionnées, cinq souches induisant de forts niveaux de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et capables de restaurer la barrière intestinale et une souche capable de renforcer fortement cette barrière. Ces souches ont été ensuite évaluées en modèles *in vivo* de colites chronique et aiguë induites par du TNBS (2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid). De façon intéressante, les souches

protégeant en colite aigüe ne protègent pas aussi efficacement en colite chronique et inversement.

Nous avons poursuivi la sélection de souches ou mélanges de souches dans le contexte de l'obésité et des maladies métaboliques associées. Nous avons utilisé les mêmes critères que précédemment (capacités anti-inflammatoires et à restaurer la barrière intestinale) complétés par l'étude de la capacité des souches à limiter l'accumulation des lipides dans un modèle *in vitro* de différenciation adipocytaire basé sur l'utilisation de la lignée 3T3-L1 et à induire la sécrétion de peptides entéro-endocrines impliqués notamment dans la satiété par l'utilisation de la lignée murine de cellules entéro-endocrine STC-1. Trois mélanges de souches et une souche isolée ont été sélectionnées et évaluées dans un modèle murin d'obésité induite par un régime hyperlipidique à 45% de gras. Nous avons pu mettre en évidence les capacités positives d'un mélange de deux souches et d'une souche seule à réduire la prise de poids, ainsi que l'inflammation dans le tissu adipeux.

Ces résultats indiquent que des criblages *in vitro* basés sur l'étude des propriétés immunomodulatrices, ainsi que des capacités à restaurer la barrière, à diminuer l'accumulation des lipides et à induire des peptides de satiété, permettent une pré-sélection de souches ou mélanges de souches ayant un effet protecteur et démontrent à nouveau que les capacités bénéfiques des probiotiques sont souche-dépendantes et spécifiques des modèles ciblés.

## ABSTRACT

Recent studies have reported that the microbiota is involved in intestinal homeostasis by contributing to the morphological development, the education of the immune system, the mechanisms of defense, and to metabolic regulation. Dysbiosis of this microbiota as well as reduction in bacterial diversity has been observed in various chronic pathologies such as chronic inflammatory diseases (IBD) and obesity. The microbiota thus constitutes a therapeutic target of choice in the management of these chronic diseases. Probiotics, which are beneficial microorganisms for the host represent therefore an interesting alternative, however their selection criteria need to be improved.

In a first study, we were able to highlight the beneficial properties of a mixture of two probiotics comprising a bifidobacteria and a lactobacilli, in a murine model of high fat diet (HFD)-induced obesity (Alard et al., 2016). This probiotic mixture significantly reduced weight gain, improved inflammatory and metabolic parameters including insulin resistance, and increased intestinal expression of receptors involved in short-chain fatty acid (AGCC) recognition. It also promoted in an artificial intestinal system the production of butyrate and propionate, the two main AGCCs. The protective effects were associated with the improvement of microbiota dysbiosis, in particular the restoration of the abundance of *Akkermansia muciniphila*.

The main objective of this thesis was then to select within a collection of 23 bacterial strains provided by PiLèJe, one or more probiotic strain (s) possessing protective properties against IBD and obesity. Immunomodulatory properties of the strains and their ability to strengthen the intestinal barrier were studied *in vitro* using human mononuclear blood cells and an *in vitro* model of epithelial permeability induced by the sensitization of a Caco-2 cells monolayer with hydrogen peroxide. Six strains were selected, five strains inducing high levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and capable of restoring the intestinal barrier and a strain capable of strongly reinforcing this barrier. These strains were then evaluated in *in vivo* models of TNBS (2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid)-induced chronic and acute colitis. Interestingly, strains able to rescue mice from acute colitis did not protect as efficiently in chronic colitis and vice versa.

The selection of strains or mixtures was then pursued in the context of obesity and associated metabolic diseases. We used the same criteria as previously (anti-inflammatory capacities and to restore the intestinal barrier) in addition with the capacity of the strains to limit the accumulation of lipids in an *in vitro* model of adipocyte differentiation based on the use of the 3T3-L1 cell line and to induce the secretion of entero-endocrine peptides, notably involved in satiety, by the use of the murine STC-1 entero-endocrine cell line. Three mixtures and one single strain were selected and evaluated in a mouse model of obesity induced by 45% HFD diet. We demonstrated the positive capacities of a mixture composed of two strains and the single strain to reduce weight gain, as well as adipose tissue inflammation.

These results indicate that *in vitro* screenings based on the immunomodulatory properties, the capacity to restore the gut barrier, to decrease lipid accumulation and to induce gut peptides allow pre-selection of strains or mixtures exhibiting protective effects and demonstrate that the beneficial capacities of probiotics are strain-dependent and specific to the targeted models.

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>2</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>19</b>
<b>Chapitre 1 : Homéostasie immunitaire et métabolique de l'intestin .....</b>	<b>19</b>
<b>I. Présentation générale du tube digestif.....</b>	<b>19</b>
<b>A. ANATOMIE DU TUBE DIGESTIF .....</b>	<b>19</b>
1. DESCRIPTION GENERALE.....	19
2. LA PAROI DE L'INTESTIN.....	20
<b>B. LA MUQUEUSE INTESTINALE .....</b>	<b>21</b>
3. COMPOSITION DE L'EPITHELIUM .....	21
4. BARRIERE INTESTINALE ET PERMEABILITE.....	23
5. MUCUS.....	25
6. LE SYSTEME IMMUNITAIRE ASSOCIE.....	26
<b>II. Immunité innée et adaptative.....</b>	<b>28</b>
<b>A. L'IMMUNITE INNEE.....</b>	<b>28</b>
1. LES CELLULES IMMUNITAIRES « INNEES » .....	28
2. LA RECONNAISSANCE DES ANTIGENES MICROBIENS .....	30
3. LES MOLECULES ANTI-MICROBIENNES .....	33
<b>B. L'IMMUNITE ADAPTATIVE.....</b>	<b>34</b>
1. LES CELLULES DENDRITIQUES.....	34
2. LES LYMPHOCYTES T ET B .....	36
a. Les lymphocytes B et la réponse humorale .....	36
b. La réponse cellulaire T.....	37
<b>III. Les fonctions métaboliques du tube digestif .....</b>	<b>38</b>
<b>A. L'ABSORPTION INTESTINALE.....</b>	<b>38</b>
1. LE PASSAGE TRANSCELLULAIRE .....	38
2. LE PASSAGE PARACELLULAIRE .....	39
<b>B. HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE ET LIPIDIQUE .....</b>	<b>40</b>



1.	L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE .....	40
2.	HOMEOSTASIE LIPIDIQUE .....	43
<b>C.</b>	<b>FONCTION ENDOCRINE .....</b>	<b>44</b>
<b>D.</b>	<b>LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE .....</b>	<b>46</b>
<b>E.</b>	<b>RELATION INTESTIN/CERVEAU .....</b>	<b>47</b>
<b>Chapitre 2 Le microbiote et les maladies chroniques .....</b>		<b>49</b>
<b>I.</b>	<b>Le Microbiote.....</b>	<b>49</b>
<b>A.</b>	<b>DEFINITION .....</b>	<b>49</b>
<b>B.</b>	<b>COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL .....</b>	<b>49</b>
<b>C.</b>	<b>IMPLANTATION DU MICROBIOTE .....</b>	<b>51</b>
<b>II.</b>	<b>Méthodes d'analyse .....</b>	<b>53</b>
1.	LE METAGENOME.....	54
2.	LE TRANSCRIPTOME.....	55
3.	LE PROTEOME .....	55
4.	LE METABOLOME .....	55
<b>III.</b>	<b>Rôle du microbiote .....</b>	<b>55</b>
<b>A.</b>	<b>FONCTION DE MATURATION PHYSIOLOGIQUE .....</b>	<b>56</b>
<b>B.</b>	<b>FONCTION IMMUNITAIRE ET BARRIERE.....</b>	<b>57</b>
<b>C.</b>	<b>FONCTION DIGESTIVE ET METABOLIQUE .....</b>	<b>59</b>
<b>IV.</b>	<b>Mise en évidence de dysbioses dans diverses pathologies.....</b>	<b>61</b>
<b>V.</b>	<b>Microbiote et pathologies chroniques.....</b>	<b>64</b>
<b>A.</b>	<b>L'OBESITE .....</b>	<b>64</b>
1.	INTRODUCTION GENERALE .....	64
2.	EPIDEMIOLOGIE .....	66
a.	Dans le monde.....	66
b.	En France.....	66
3.	ASPECT ECONOMIQUE .....	67
4.	LES DIFFERENTS TYPES D'OBESITE, LES COMPLICATIONS ET LES FACTEURS DE RISQUES .....	68
5.	DEREGULATION METABOLIQUE ET FACTEURS IMPLIQUES.....	69
a.	L'obésité : un problème de balance énergétique .....	69
i.	Le tissu adipeux brun.....	70
ii.	Le tissu adipeux blanc.....	70
	Différenciation du tissu adipeux .....	71
	Homéostasie glucidique .....	71

b. L'obésité : une maladie inflammatoire de bas grade.....	71
c. L'obésité : un intestin plus perméable .....	72
d. L'obésité : un facteur clé dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 .....	73
6. OBESITE ET DYSBIOSE DU MICROBIOTE.....	74
<b>B. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN.....</b>	<b>75</b>
1. INTRODUCTION GENERALE .....	75
2. EPIDEMIOLOGIE ET ETHIOLOGIE .....	75
3. MICI ET BALANCE IMMUNITAIRE .....	76
4. PERTE DE CONTROLE DU MICROBIOTE, DEFAUT DANS LES CELLULES DE PANETH .....	77
5. AUTOPHAGIE ET MICI .....	77
6. LES BACTERIES PATHOGENES ASSOCIEES .....	78
7. ROLE DU MICROBIOTE DANS LES MICI.....	78
<b>Chapitre 3 : Ciblage du microbiote comme nouvelle alternative thérapeutique .....</b>	<b>80</b>
<b>I. Les différentes méthodes de modulation du microbiote .....</b>	<b>80</b>
A. LA TRANSPLANTATION FECALE .....	80
B. LES PREBIOTIQUES .....	81
C. LES PROBIOTIQUES .....	82
<b>II. Les Probiotiques .....</b>	<b>83</b>
A. DEFINITIONS .....	83
B. SOUCHES UTILISEES.....	83
C. LES EFFETS BENEFIQUES DES PROBIOTIQUES .....	84
1. UTILISATION DES PROBIOTIQUES DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN .....	85
2. IMPACT DES PROBIOTIQUES DANS L'OBESITE .....	86
D. MECANISMES D'ACTION DES PROBIOTIQUES .....	88
1. LE RENFORCEMENT DE LA BARRIERE .....	88
2. MODULATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....	89
3. LES EFFETS ANTIMICROBIENS DES PROBIOTIQUES .....	90
4. MODULATION DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE.....	91
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>93</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>95</b>
<b>Article 1 : Des probiotiques sélectionnés protègent les souris de l'obésité en remodelant le tissu adipeux et la composition du microbiote.....</b>	<b>95</b>
<b>Travaux Complémentaires à l'article 1.....</b>	<b>98</b>

I.	Impact des souches <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMG S-28148 et <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG P-28149 sur la production de peptides entéro-endocrines ..	98
II.	Impact de l'administration des souches <i>L. rhamnosus</i> LMG S-28148 et <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG P-28149 dans un modèle murin d'obésité induite par la consommation d'un régime à 45% de gras .....	100
	Article 2 : Sélection de souches probiotiques à haut potentiel dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques intestinales par approches <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . .....	109
	Article 3 : Stratégie de sélection de souches probiotiques à haut potentiel dans le traitement de l'obésité.....	112
	Travaux complémentaires à l'article 3 .....	116
I.	Effets de souches sélectionnées pour leurs capacités protectrices <i>in vitro</i> dans un modèle d'obésité induite par la consommation d'un régime hyperlipidique à 60% de gras .....	116
II.	Comparaison de l'efficacité des mélanges sélectionnés dans les régimes d'obésité à 45% et 60% de gras .....	119
III.	Effets des souches sur le GLP-1 .....	120
IV.	Travaux en cours .....	122
	MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRE.....	123
	DISCUSSION .....	124
I.	L'utilisation thérapeutique des probiotiques dans le contexte de l'obésité induite par un régime à 60% ou à 45% de gras .....	124
II.	L'utilisation thérapeutique des probiotiques dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales.....	133
III.	Conclusion générale et perspectives .....	135
	TRAVAUX COLLABORATIFS ANNEXES .....	137
I.	Le processus d'atomisation préserve la capacité de protection d'une souche de <i>Bifidobacterium lactis</i> isolée de lait maternel contre des colites aiguë et chronique chez la souris.....	137
II.	Projet ANR BiopanEx : Un criblage d'immuno-stimulateurs de la cellule de Paneth appliqué à la Maladie de Crohn.....	138
III.	Projet Adipofume .....	139
	ANNEXE 1 .....	140
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	172

# LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

## Publications

**Alard J**, Peucelle V, Boutillier D, Kuylle S, Desramaut J, Pot B, Holowacz S and Grangette C. Strategies for the selection of efficient probiotics against obesity using *in vitro* screening and *in vivo* murine model high fat diet-induced obesity, Manuscript in preparation

**Alard J**, Peucelle V, Boutillier D, Breton J, Kuylle S, Pot B, Holowacz S and Grangette C. Comparative protective capacities of selected probiotics in acute and chronic murine models of colitis. Beneficial microbes, Manuscript submitted to Beneficial Microbes

Burns P, **Alard J**, Hrdý J, Boutillier D, Páez R, Reinheimer J, Pot B, Vinderola G, Grangette C. Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. Scientific Reports, 2017 Feb 24;7:43211

**Alard J**, Lehrter V, Rhimi M, Mangin I, Peucelle V, Abraham AL, Mariadassou M, Maguin E, Waligora-Dupriet AJ, Pot B, Wolowczuk I et Grangette C. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. Environmental Microbiology, 2016, 18(5):1484-1497

## Brevets

Quintens J, Lienart Van Lidth de Jeude J, Grangette C, Pot B, Makki K, Wolowczuk I, **Alard J**, Lehrter-Valenti V. Composition comprising *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* LMG P-28149. Patent WO 2015/121458 A2, 2015; US 2016/0354418 A1

Quintens J, Lienart Van Lidth de Jeude J, Grangette C, Pot B, Chamailard M, Wolowczuk I, **Alard J**, Gosset P, Pichavant M. Composition comprising at least one probiotic, preferably in the live state, for use in the curative treatment of excess weight or in the preventive treatment of body weight gain in human beings in the process of giving up smoking or having smoked. WO 2015/121455 A1

## **Communications orales** (auteur ayant présenté en souligné)

**Alard J**, Peucelle V, Boutillier D, Desramaut J, Breton J, Kuylle S, Pot B, Holowacz S and Grangette C. Targeting gut microbiota in obesity and IBD: Protective effects of selected probiotic strains. 20ème Club des Bactéries Lactiques (CBL), Lille, 2017

**Alard J**, Lehrter V, Rhimi M, Mangin I, Peucelle V, Abraham AL, Mariadassou M, Maguin E, Waligora-Dupriet AJ, Pot B, Wolowczuk I et Grangette C. Modulation nutritionnelle du microbiote intestinal par les probiotiques: impact bénéfique dans un modèle murin d'obésité. XXXIVème colloque du Club d'Etude des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), Lille, 2016

**Alard J**, Lehrter V, Rhimi M, Abraham AL, Peucelle V, Mangin I, Mariadassou M, Maguin E, Waligora-Dupriet AJ, Pot B, Wolowczuk I et Grangette G. Modulation nutritionnelle du microbiote intestinal par les probiotiques: impact bénéfique dans un modèle murin d'obésité. Journées hors site CIIL, Lille, 2016

**Rémy G**, **Alard J**, Baron M, Ayari A, Kervoaze G, Gosset P, Wolowczuk I, Grangette C et Pichavant M. Conséquences Métaboliques et Immunologiques du sevrage Tabagique chez la souris Normopondérale ou Obèse. Journées de recherche respiratoire (J2R), Nice, 2016.

**Alard J**, Lehrter V, Rhimi M, Abraham AL, Peucelle V, Mangin I, Mariadassou M, Maguin E, Waligora-Dupriet AJ, Pot B, Wolowczuk I and **Grangette C**. The gut microbiota : a novel target in the management of obesity. III Congreso Bioquímico del Litoral y XVI Jornadas Argentinas de Microbiología, Santa Fe, Argentina, 2015

**Alard J**, Lehrter V, Peucelle V, Mangin I, Waligora-Dupriet AJ, Pot B, Wolowczuk I et Grangette C. Modulation nutritionnelle du microbiote intestinal par les probiotiques: impact bénéfique dans un modèle murin d'obésité. 20ème Club des Bactéries Lactiques (CBL), Lille, 2015

**Grangette C**, **Alard J**, Lehrter V, Peucelle V, Mangin I, Waligora-Dupriet AJ, Pot B and Wolowczuk I. Selected probiotics counteract diet-induced obesity and insulin resistance in mice through remodeling adipose tissue and microbiota composition. International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics IPC2015, Budapest, Hongria, 2015

**Alard J**, Makki K, Lehrter V, Peucelle V, Taront S, Mangin I, Froguel P, Waligora-Dupriet AJ, Pot B and Wolowczuk I and **Grangette C**. Probiotics counteract diet-induced obesity and insulin resistance through remodeling mice adipose tissue and microbiota composition. Pharmabiotics conference, Paris, 2014

**Alard J**, Makki K, Lehrter V, Peucelle V, Taront S, Mangin I, Froguel P, Waligora-Dupriet AJ, Pot B, Wolowczuk I and Grangette C. Selected probiotic mixture counteracts diet-induced obesity and insulin resistance in mice through the remodeling of adipose tissue cell population and microbiota composition. Gremi: When inflammation meets metabolic diseases, Paris, 2014

Pot B, **Alard J**, Peucelle V, Mangin I, Waligora-Dupriet AJ, Wolowczuk I and Grangette C Selected probiotics can limit weight gain and insulin resistance in diet-induced obese mice. 17deVoedings-en Gezondheidscongres, Brussel, Belgium, 2014

### **Communications affichées**

Zaylaa M, **Alard J**, Peucelle V, Boutillier D, Al Kassaa I, Dabboussi F, Pot B and Grangette C. Probiotics in IBD: combining *in vitro* and *in vivo* models for selecting strains with both anti-inflammatory potential and capacity to restore the gut epithelial barrier. 20ème Club des Bactéries Lactiques (CBL), Lille, 2017

Cuffaro B, Bourgin M, Michajlovova B, Kriaa A, Peucelle V, Boutillier D, Boudebbouze S, **Alard J**, Rhimi M, Maguin E and Grangette C. Targeting the gut microbiota for the development of a new generation of probiotics in obesity. 20ème Club des Bactéries Lactiques (CBL), Lille, 2017

Alard J, Peucelle V, Boutillier D, Desramaux J, Pot B, Holowacz S and Grangette C. Characterization of probiotic strains for their beneficial properties against inflammation and obesity. Journée André Verbert (JAV), Lille, 2016

Alard J, Peucelle V, Boutillier D, Desramaux J, Breton J, Kuylle S, Pot B, Holowacz S and Grangette C. Targeting gut microbiota in obesity and IBD: Protective effects of selected probiotic strains. 4<sup>th</sup> word congress on Targeting microbiota, Paris, 2016

**Alard J**, Peucelle V, Boutillier D, Desramaux J, Breton J, Kuylle S, Pot B, Holowacz S and Grangette C. Characterization of probiotic strains for their beneficial properties against IBD and obesity. 10th European Mucosal Immunology Group meeting (EMIG 2016), Copenhagen, Danemark, 2016

Burns P, **Alard J**, Hrdy J, Boutillier D, Páez R, Reinheimer J, Pot B, Vinderola G and Grangette C. The effect of spray-drying on the protective capacity of the breast milk derived

*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 on acute and chronic colitis in mice. The 26th Annual Biocity Symposium Microbes R Us, Turku, Finland, 2016

Burns P, Hrdý J, **Alard J**, Lavari L, Reinheimer J, Pot B, Grangette C, Vinderola G. Estudio de los efectos de bifidobacterias en modelos de inflamación intestinal aguda y crónica. Influencia de procesos tecnológicos III Congreso Bioquímico del Litoral y XVI Jornadas Argentinas de Microbiología, Santa Fe, Argentina, 2015

**Alard J**, Makki K, Lehrter V, Peucelle V, Mangin I, Waligora-Dupriet AJ, Pot B, Wolowczuk I and Grangette C. Probiotics counteract diet-induced obesity and insulin resistance in mice through remodeling adipose tissue and microbiota composition. 12<sup>th</sup> International Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands, 2014

Grangette C, **Alard J**, Lehrter V, Peucelle V, Mangin I, Waligora-Dupriet AJ, Pot B, Wolowczuk I. Probiotics counteract diet-induced obesity and insulin resistance in mice through remodeling adipose tissue and microbiota composition. Joint annual meeting of the French society for immunology and the French cytometry association (SFI/AFC), Lille, 2014

Burns P, Hrdý J, **Alard J**, Zacarías F, Lavari L, Reinheimer J, Pot B, Vinderola G, Grangette, C. Multiple approaches for the study of the effects of bifidobacteria on intestinal health: Influence of food technology. Journées franco-argentines de la coopération scientifique pour l'innovation. París, 2014

Wolowczuk I, Valenti V, **Alard J**, Makki K, Peucelle V, Taront S, Froguel P, Pot B and Grangette C. Effect of probiotic consumption on obesity and related inflammation in mice. Cell symposia: Microbiome and host cell, Lisbon, Portugal, 2013

Wolowczuk I, Valenti V, **Alard J**, Makki K, Peucelle V, Taront S, Froguel P, Pot B, Grangette C. Effect of probiotic consumption on obesity and related inflammation in mice. Probiotics, Prebiotics, and the Host Microbiome: The Science of Translation, The New York academic of Sciences, New York, USA, 2013

## LISTE DES ABREVIATIONS

AB Acide Biliaire	DPP-IV Dipeptidyl-peptidase IV
ADN Acide DésoxyriboNucléique	DSS Dextran Sulfate Sodium
AG Acide Gras	EFSA Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
AGCC Acide Gras à Chaîne Courte	EWAT Epididymal Adipose Tissue
AgRP Agouti Recepteur	FA Fatty Acid
AIEC Escherichia coli adhérents-invasifs	FABP Fatty Acid Binding Protein
AMM autorisation de mise sur le marché	FAE Follicule Associated Epithelium
AMPK AMP-kinase	FAO Food and Agricultural Organization
aP2 adipocyte fatty acid binding protein-2	FRM Fondation pour la Recherche Médicale
ApocII apolipoprotein CII	FXR Farnesoid X Receptor
ARN Acide RiboNucléique	G6P Glucose 6 Phosphate
ARNm ARN messenger	GABA Acide $\gamma$ -AminoButyrique
ARNr ARN ribosomique	GALT Gut-Associated Lymphoid Tissue
ATG Autophagy related genes	GIP Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
ATG16L1 Autophagy 16 Like 1	GIT Tractus Gastro-Intestinal
ATP Adénosine TriPhosphate	GK Glucokinase
BA Bile Acids	GLP-1 Glucagon Like Peptide 1
BAT tissu adipeux brun	GLP-2 Glucagon Like Peptide 2
BSH Bile Salt Hydrolase	GLUT glucose transporteur, 31
C/EBP CCAAT/enhancer-binding protein	GPR récepteurs couplés aux protéines G
CARD Caspase-activation and recrutement domain	GTT Glucose Tolerance Test
CCK cholécystokinine	HAMPs Homeostasis-altering molecular processes
CFU colony forming unit	HDL High Density Lipoprotein
CLR Lectines de type C	HFD high-fat diet/régime hypercalorique riche en graisse
CMH Complexe Majeur d'Histocompatibilité	HOMA-IR Homeostatic Model for Assessment of the IR index
CRP C-reactive protein	
DAMP damage-associated molecular patterns	
DC cellules dendritiques	



i.p. intra-peritoneal  
 IBS Syndrome du côlon irritable  
 IEL Lymphocytes Intra-Epithéiaux  
 IFN interféron  
 Ig immunoglobulines  
 IL- Interleukine  
 ILCs Cellules Lymphoïdes Innées  
 ILF Follicules Lymphoïdes Isolés  
 IMC Indice de Masse Corporelle  
 IMG Indice de Masse Grasse  
 IR Insulin Resistance  
 IRDES Institut de Recherche et  
 Documentation en Economie de la Santé  
 IRF Interferon regulatory factor  
 IRGM Immunity related GTPase M  
 IRS insulin receptor substrate  
 IS Insulin Sensitivity  
 ITT Insulin Tolerance  
 IU International Unit  
 IκBα Inhibitor of NF-κBα  
 JAM Junctional Adhesion Molecule  
 LDL Low Density Lipoprotein  
 LFD Low-Fat Diet  
 LPL Lipoprotéine lipase, 34  
 LPS Lipopolysaccharide  
 LRR Leucine-rich repeat  
 LTA Acide Lipoteichoïques  
 LTi Lymphoid Tissue Inducer Cells  
 MALT Mucosa-Associated Lymphoid  
 Tissues  
 MAMP microbial associated molecular  
 patterns  
 MC Maladie de Crohn  
 MCP-1 monocyte chioattractant protein 1  
 MDP Macrophage Dendritic cell Precursor  
 MICI Maladie Inflammatoire Chronique de  
 l'Intestin,  
 MLN ganglions mésentériques  
 MUC2 Mucine de type 2  
 MUC3 Mucine de type 3  
 MyD88 Myeloid differentiation  
 ND non déterminé  
 NEFA non-esterified fatty acid  
 NKT Natural Killer T  
 NLR Nucleotide oligomerization domain  
 like receptor  
 NOD Nucleotide-binding oligomerisation  
 domain  
 NPY/npv NeuroPeptide YY  
 OCDE Organisation de coopération et de  
 développement économique  
 OMS Organisation Mondiale de la Santé  
 OTU operational taxonomic unit/unités  
 taxonomiques  
 PAM Peptides Anti-Microbiens  
 PAMP pathogen associated molecular  
 patterns  
 PBMC Peripheral Blood Mononuclear  
 Cells  
 PBS Phosphate Buffered Saline  
 PCA Principal Component Analysis  
 POMC Pro-OpioMélanocortine  
 PP Plaques de Peyer,  
 PPARγ Peroxisome proliferator-activates  
 receptor gamma  
 PRR pattern recognition receptors  
 PXR pregnane X receptor,  
 QPS présomption d'innocuité reconnue

RCH Rectocolite Hémorragique  
RLR Retinoic acid inducible gene 1 like  
receptor  
ROR $\gamma$ t RAR-related orphan receptor  
gamma  
SCFA Short Chain Fatty Acid  
SCWAT Subcutaneous Adipose Tissue  
SFB Segmented Filamentous Bacteria  
SGLT Sodium/Glucose coTransporteur  
SHIME Simulator of the Human Intestinal  
Microbial Ecosystem  
SNE Système Nerveux Entérique  
Srebp-1c sterol regulatory binding protein-  
1  
T2D type 2 diabetes  
TCR Récepteur à l'antigène  
TEER Résistance Electrique Trans-  
Epithéliale  
TG triglycérides  
TGR5, récepteur couplé aux protéines G  
TIR Toll/IL-1R interaction domain,  
TLR Toll like receptor  
TNBS 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid  
TRIF TIR-domain-containing adapter-  
inducing interferon- $\beta$   
TTGE Temporal Temperature Gel  
Electrophoresis  
UCP-1 uncoupling protein-1  
VDR vitamin D receptor  
VLDL Very Low Density Lipoprotein  
WAT tissu adipeux blanc  
WHO World Health Organization  
ZO Zonula Occludens



# **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre 1 : Homéostasie immunitaire et métabolique de l'intestin**

### **I. Présentation générale du tube digestif**

L'appareil digestif est composé de l'œsophage, de l'estomac, du tube digestif en lui-même et est délimité par deux orifices : la cavité buccale (orifice supérieur) et l'anus (orifice inférieur). Il comporte des glandes annexes : les glandes salivaires, le pancréas, le foie et la vésicule biliaire, qui aident à la digestion. L'appareil digestif est responsable de la dégradation des aliments et de leur transformation en nutriments assimilables par l'organisme.

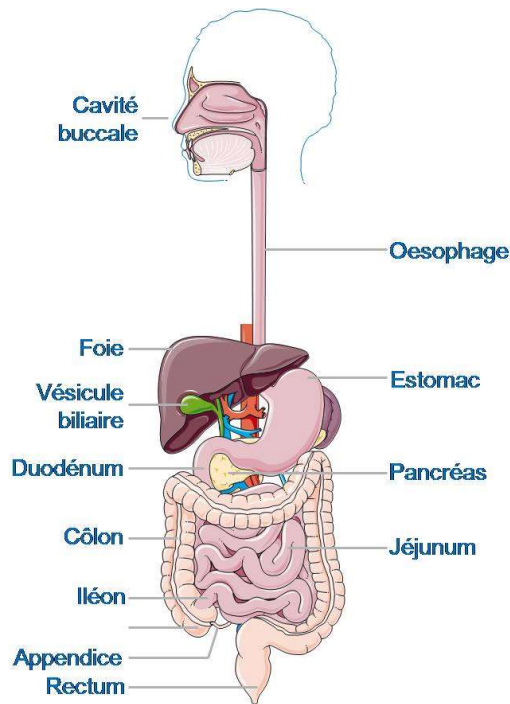
#### **A. Anatomie du tube digestif**

##### **1. Description générale**

Le tube digestif mesure en moyenne 8 mètres de long et peut être divisé en deux parties, l'intestin grêle et le gros intestin.

L'intestin grêle est lui-même composé de trois parties, le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum commence après le sphincter inférieur de l'estomac -appelé pylore- et l'iléon se termine au début du cæcum. Sa taille est d'environ 3,5 fois la longueur du corps soit environ 6 mètres pour l'homme et sa fonction principale est d'absorber les nutriments libérés par les actions mécanique et chimique des organes et glandes annexes.

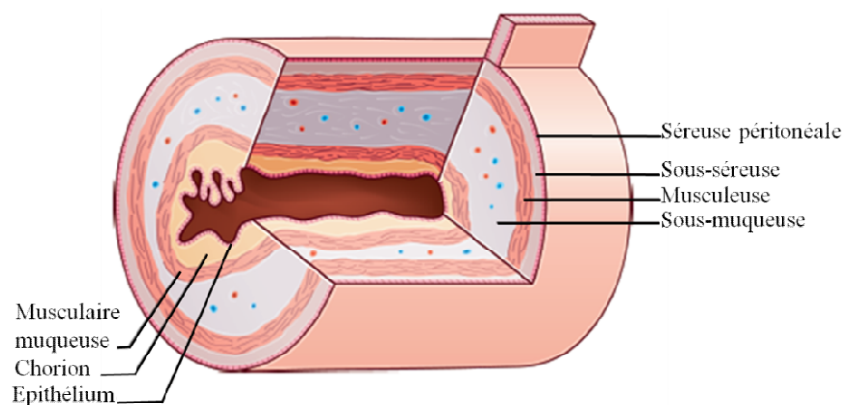
Le gros intestin, appelé aussi côlon, est également divisible en trois parties : le cæcum qui est, chez l'homme, un reliquat dû à l'évolution (appendice), le côlon (ascendant, transverse et descendant), et le rectum qui se termine par l'anus. Il est plus petit (~1,5 mètres) et ses fonctions principales sont la réabsorption des électrolytes et de l'eau et le contrôle de l'élimination des fèces. La discrimination des différentes sections ne peut se faire qu'au niveau histologique.



**Figure 1 : Coupe schématisique du système digestif de l'homme (D'après *Servier Medical Art*).**

## 2. La paroi de l'intestin

La paroi de l'intestin est composée de quatre tuniques qui adhèrent entre elles, et qui sont à partir de la lumière intestinale : la muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse, puis le tissu conjonctif, dans ce cas du péritoine (Figure 2).



**Figure 2 : Structure de la paroi digestive (Beaugerie and Sokol, 2014)**

La musculuse est une couche de fibres musculaires lisses longitudinale externe et circulaire interne qui sert au péristaltisme. La sous-muqueuse est un tissu conjonctif lâche contenant les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les fibres nerveuses ; au niveau du

duodénum, elle contient également les glandes de Brunner, qui ont pour fonction de produire du mucus et d'aider à la digestion. La muqueuse est composée d'un épithélium, d'un chorion ou *lamina propria*, et de cellules musculaires lisses.

## B. La muqueuse intestinale

### 3. Composition de l'épithélium

L'épithélium intestinal est complexe et présente différentes structures qui augmentent la surface de contact avec les nutriments (Figure 3) :

- les cryptes de Lieberkühn ; ce sont des invaginations de l'épithélium, composées de cellules caliciformes et des cellules de Paneth
- les villosités ; composées d'entérocytes, elles sont réparties tout le long de l'intestin et sont en relation étroite avec les vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse (~0,5 à 1,5 mm) ;
- les microvillosités ; elles sont présentes à la surface apicale des entérocytes dont elles forment la bordure en brosse et ont une taille de  $1\mu\text{m}$ , augmentant également la surface d'échange.

Une fois dépliée, la surface de cette muqueuse est d'environ  $300\text{ m}^2$ . C'est la plus grande surface du corps humain en contact avec l'environnement extérieur.

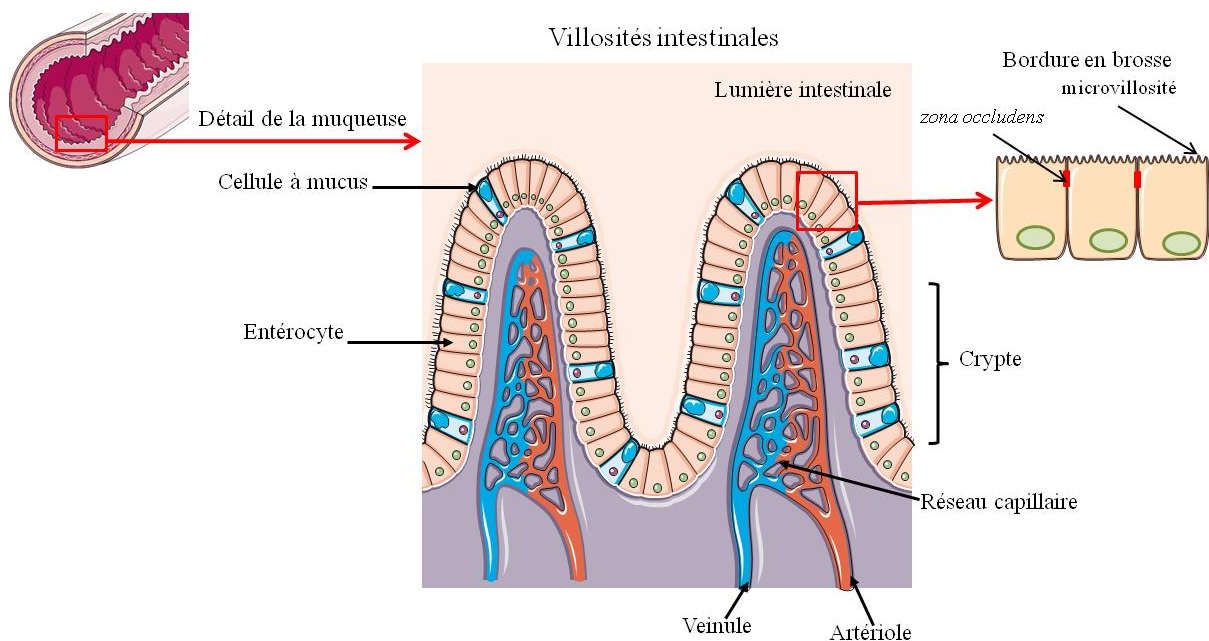
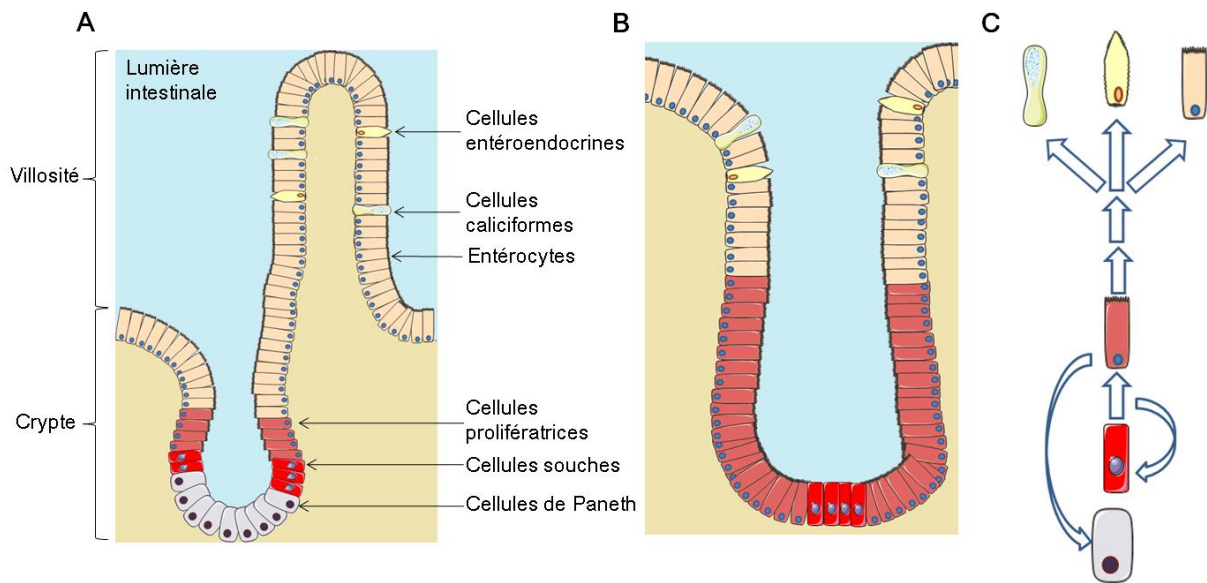


Figure 3 : Schéma de la structure de la muqueuse (D'après Servier Medical Art.)

L'épithélium du tube digestif possède 5 grands types cellulaires (Figure 4):

- les entérocytes sont les cellules polarisées qui composent les villosités (à environ 80 %), elles ont un rôle important dans le phénomène d'absorption intestinale. Ces cellules sont polarisées avec un pôle apical vers la lumière, et un pôle baso-latéral vers la *lamina propria*. Elles sont liées et maintenues entre elles par des jonctions intercellulaires.
- les cellules gobelet ou caliciformes sécrètent du mucus pour protéger la muqueuse intestinale. Sa production est plus importante dans le côlon.
- les cellules de Paneth présentes au fond des cryptes de Lieberkühn aident à la défense immunitaire de la barrière intestinale en sécrétant des peptides antimicrobiens (le lysozyme, la phospholipase A2, RegIII $\beta$  et  $\gamma$ , les  $\alpha$ -défensines). Elles sont fortement présentes dans l'iléon distal et absente du côlon (Clevers and Bevins, 2013).
- les cellules entéro-endocrines, distribuées tout le long du tube digestif, représentent moins de 1% des cellules de l'épithélium intestinal. Elles sécrètent différents types d'hormones et d'enzymes (*cf* partie III. C.).
- les cellules « M » ou Microfold situées au niveau des follicules lymphoïdes (FAE *Follicle Associated Epithelium*) et en particulier des plaques de Peyer transportent des antigènes, micro-organismes et particules inertes de la lumière intestinale jusqu'aux cellules du système immunitaire situées dans la *lamina propria* (*cf* partie I. B. 4).

D'autres cellules moins représentées sont retrouvées, telles que les cellules « tuft » dont le rôle est encore mal connu ou les cellules souches, au fond des cryptes, qui permettent le renouvellement rapide de l'épithélium.



**Figure 4 : Organisation cellulaire de l'épithélium digestif.** (A) Organisation cellulaire schématique d'une crypte et d'une villosité dans l'intestin grêle (B) Organisation cellulaire schématique dans le côlon (C) Schéma de la différenciation cellulaire dans l'épithélium intestinal (D'après *Servier Medical Art*).

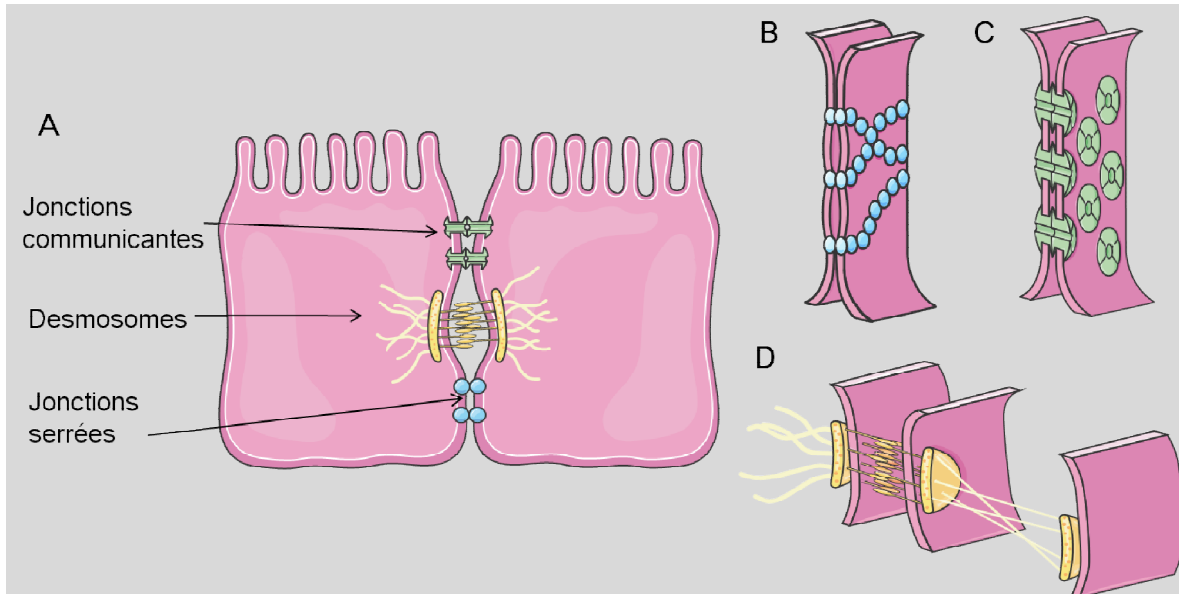
#### 4. Barrière intestinale et perméabilité

Les rôles principaux du tube digestif sont la digestion, l'absorption de l'eau et des nutriments issus de l'alimentation et une fonction de protection physique empêchant le passage d'éléments indésirables, tels que les bactéries pathogènes, les allergènes ou encore les toxines. Cette barrière sélective est possible grâce à une séparation dynamique qui contrôle étroitement le trafic, par l'intermédiaire de différentes jonctions cellulaires dont la fonction est de maintenir l'étanchéité entre les entérocytes polarisés tout en stoppant les microorganismes. Il y a trois types de jonctions intercellulaires :

- les jonctions serrées : l'espace inter-membranaire est étanche, elles sont responsables de l'effet barrière
- les jonctions adhérentes : elles sont responsables de la jonction intercellulaire
- les desmosomes : ce sont des jonctions d'ancrage, ils relient le cytosquelette des cellules à la matrice extracellulaire



Il existe également des canaux intercellulaires, les jonctions gap ou jonctions communicantes : disposés sous forme de plaque, ils permettent le transfert entre deux cellules juxtaposées de petites molécules ou d'ions (Figure 5).



**Figure 5 : Schéma des différents types de jonction cellulaire.** (A) Schéma de la distribution des différents types de jonctions entre deux cellules. (B) Représentation schématique de la distribution entre deux parois cellulaires des protéines de jonctions serrées et (C) des jonctions communicantes. (D) Représentation schématique d'un desmosome (D'après *Servier Medical Art*).

Les jonctions serrées de l'épithélium digestif forment une bande, la *zonula occludens*, responsable du maintien de la polarité des cellules épithéliales et sont impliquées dans la régulation de la perméabilité, en bloquant par exemple la circulation paracellulaire. Elles sont principalement constituées des protéines transmembranaires claudines et occludines et sont reliées aux protéines cytosoliques ZO (*zonula occludens* ZO-1, ZO-2 et ZO-3) qui se fixent sur l'actine du cytosquelette. Les occludines et claudines sont des molécules calcium indépendantes. Une superfamille de récepteurs membranaires, les immunoglobulines, peut être retrouvée dans les jonctions serrées : ce sont les JAM (*Junctional Adhesion Molecule*) (*Pour revue Bazzoni and Dejana, 2004; Dejana, 2004*).

Les jonctions adhérentes intercellulaires se présentent sous la forme d'une ceinture continue, la *zonula adherence*. Elles sont principalement constituées de cadhérines

(essentiellement l'E-cadhérine dans l'épithélium), protéines transmembranaires, qui se fixent au cytosquelette sur des filaments d'actines *via* les caténines  $\alpha$  et  $\beta$ .

Les jonctions serrées permettent ainsi aux cellules adjacentes d'adhérer entre elles, de former une barrière régulant le flux de petits ions et de séparer deux zones bien distinctes, empêchant la diffusion anarchique de protéines, de lipides ou le passage de pathogènes. Lorsque les jonctions serrées sont altérées, par exemple par des agents pathogènes, elles n'exercent plus leur rôle de frontière étanche et laissent passer des macromolécules d'origine alimentaire ou bactérienne. Une hyperperméabilité intestinale se développe alors chez le sujet, conduisant au déclenchement des réactions inflammatoires et auto-immunes. L'interaction entre les claudines et la structuration des jonctions serrées reste mal étudiée à ce jour, cependant un changement de charge dans les radicaux des claudines induit un changement de la sélectivité de charge de la barrière mesurable *in vitro* par la résistance électrique trans-épithéliale (TEER). L'étanchéité de la barrière peut également être évaluée par le passage de petites molécules marquées *in vitro* et *in vivo*.

## 5. Mucus

Le mucus intestinal est produit par les cellules caliciformes, une dizaine de litres est sécrétée par jour par ces cellules. Il a comme fonction première, au niveau du duodénum et du jéjunum, de lubrifier le tube digestif pour le passage des aliments. Au niveau du côlon, la couche de mucus est plus importante, elle a également un rôle de lubrification, mais aussi de protection créant une barrière entre les éléments potentiellement dangereux de la lumière et le tissu épithélial. Ce mucus sert de niche pour les bactéries commensales (Cone, 2009). La production de mucus est continue, il est éliminé au fur et à mesure par le mouvement péristaltique et par les bactéries du microbiote qui le digèrent. Les protéines qui le constituent sont des glycoprotéines, les mucines, dont MUC2 est le représentant majoritaire. Le mucus est également composé de protéines de défense du système immunitaire inné associé, comme des lysozymes, des lactoferrines, des immunoglobulines A (IgA), des protéases ou encore des défensines (Corfield et al., 2001).

## 6. Le système immunitaire associé

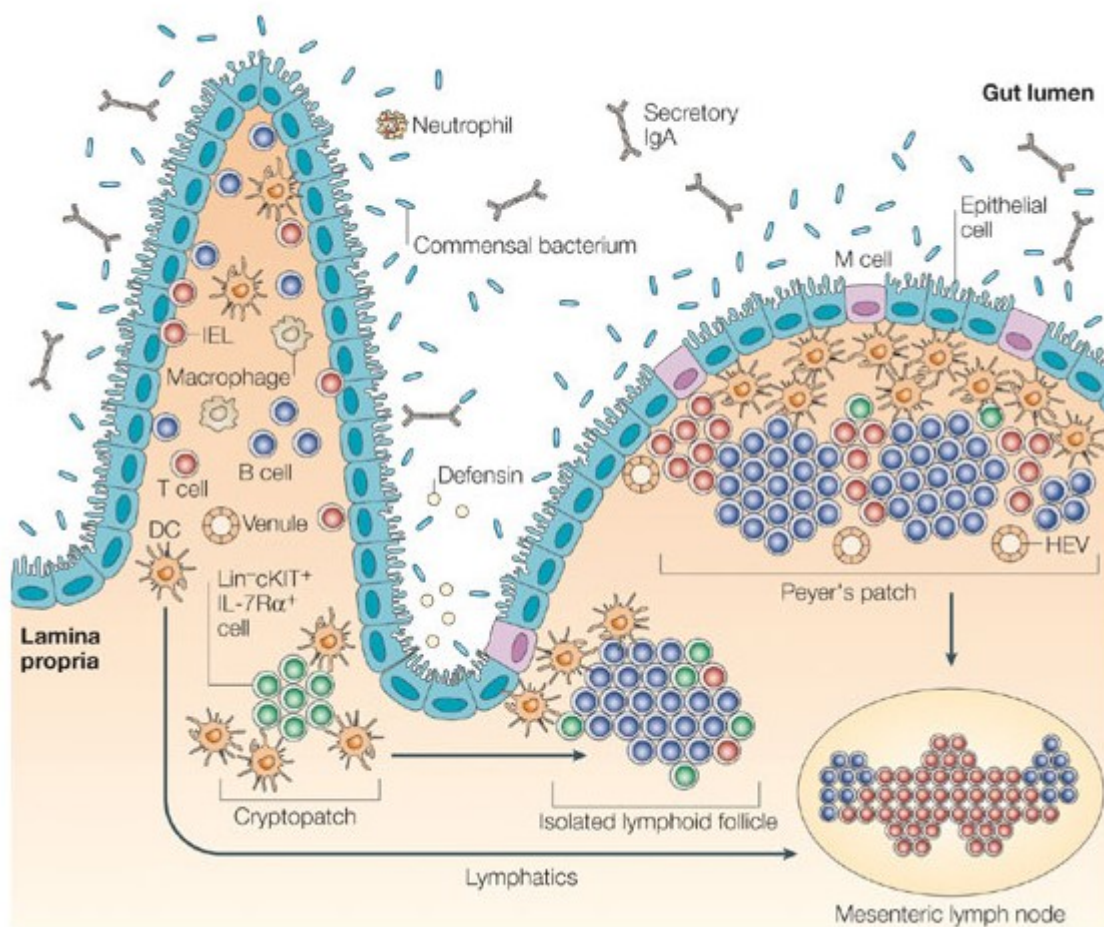
Le système immunitaire du tube digestif, comportant le GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*) et le MALT (*Mucosa-associated lymphoid tissues*), est en contact permanent avec des antigènes du soi et du non soi, d'origine alimentaire ou microbienne. Il est composé de deux catégories de tissus différenciés suivant leur type d'organisation :

- soit structurée, comme les plaques de Peyer (PP) ou les ganglions mésentériques,
- soit au contraire plus diffuse, comme les follicules lymphoïdes isolés (ILF), les cryptopatches, les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) ou les cellules immunes de la *lamina propria*.

Les plaques de Peyer sont distribuées le long de l'intestin grêle et sont plus nombreuses au niveau de l'iléon. Elles sont composées de nombreux follicules lymphoïdes, comprenant un centre germinatif composé de lymphocytes B immatures qui se différencieront en plasmocytes producteurs d'IgA et de zones inter-folliculaires regroupant des lymphocytes T naïfs et des cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques et les macrophages. Ces plaques sont surmontées d'un dôme de cellules épithéliales, incluant des cellules M (*microfold*) qui ont pour rôle d'endocyter les antigènes et les micro-organismes de la lumière et de les présenter aux cellules dendritiques (Ohno, 2016). Les ganglions mésentériques disposés en chapelets aux jonctions des vaisseaux lymphatiques contiennent également des lymphocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Les lymphocytes B disposés en follicules lymphoïdes sont surtout présents au niveau de la couche la plus externe de cet organe, appelée cortex. Le paracortex sous-jacent est peuplé de lymphocytes T et de cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques vont ainsi pouvoir capturer les antigènes, migrer vers les zones folliculaires et les présenter aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ainsi qu'aux lymphocytes B, au niveau soit des plaques de Peyer soit des ganglions mésentériques. Les cellules immunitaires vont alors pouvoir s'activer et/ou se différencier : les lymphocytes B vont notamment se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps ou immunoglobulines (Ig), principalement des IgA au niveau de l'intestin, qui peuvent être produits de façon T-dépendant ou indépendant. Ces IgA vont alors traverser la barrière sous forme d'IgA sécrétoires et neutraliser les bactéries de la lumière.

Les structures diffuses que sont les ILF (follicules lymphoïdes isolés) et les cryptopatches se développent après la primo-colonisation de l'intestin par les bactéries. Les ILF sont agencés comme les PP, mais chaque compartiment est représenté en plus faible quantité. Les cryptopatches sont des amas de cellules dendritiques et de précurseurs de cellules T trouvés dans les cryptes de l'intestin. Ils peuvent se transformer en ILF suite à des stimuli bactériens ou pro-inflammatoires (*Pour revue Eberl, 2005*). Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) sont principalement des lymphocytes T impliqués dans le maintien de l'homéostasie intestinale et sont retrouvés entre les cellules épithéliales.



**Figure 6 : Représentation schématique du système immunitaire associé.** La monocouche de cellules épithéliales constitue l'interface entre la *lamina propria* et le microbiote intestinal. Le mucus, les défensines, les neutrophiles et les IgA protègent l'épithélium. Le système immunitaire associé à l'épithélium intestinal est composé des ganglions mésentériques, des plaques de Peyer, des ILF et des cryptopatches. Les sites effecteurs sont disséminés dans l'épithélium intestinal et la *lamina propria* (Eberl, 2005).

## II. Immunité innée et adaptative

L'intestin, étant en interaction permanente avec un environnement potentiellement pathogène, doit mettre en place des mécanismes de défense appropriés tout en maintenant l'homéostasie intestinale. Le système immunitaire inné va ainsi émettre une réponse de façon rapide et non spécifique, alors que le système adaptatif répondra plus lentement, mais de façon spécifique à l'agent pathogène.

### A. L'immunité innée

Les barrières physiques et anatomiques représentent la première ligne de défense non spécifique. Au niveau intestinal, la barrière épithéliale et la couche de mucus permettent d'empêcher le passage d'agents exogènes potentiellement pathogènes. L'immunité innée, dite aussi naturelle, est la première barrière de défense de l'épithélium intestinal. La colonisation par le microbiote (*cf* Chapitre 2) permet d'empêcher l'interaction des pathogènes avec la muqueuse par un phénomène de compétition ou d'exclusion.

#### 1. Les cellules immunitaires « innées »

Les cellules dendritiques de par leur fonction de sentinelles mettent en place et régulent la réponse immunitaire innée et induisent la réponse immunitaire adaptative (*cf* partie B. 1.). Lorsqu'un antigène est reconnu, la cellule dendritique va produire des cytokines et recruter des neutrophiles, des monocytes/macrophages et des cellules NK (*Natural Killer*) et NKT (*Natural Killer T*) (Ko and Chang, 2015).

Si l'antigène est reconnu comme molécule du soi, une réponse de type tolérogène caractérisée par la production de l'interleukine (IL-) 10 sera mise en place, mais si l'antigène est reconnu comme du non-soi, une réponse immunitaire adaptative sera induite (*cf* partie B. 1.).

De nombreuses autres cytokines pro-inflammatoires dont l'effet dépend du contexte cellulaire et moléculaire peuvent également être induites (IL-1 $\beta$ , IL-6...). Les cellules immunitaires et épithéliales produisent diverses chimiokines ayant un pouvoir chimiotactique, ayant pour but d'attirer et recruter les cellules avoisinantes. Leur interaction avec des récepteurs spécifiques permet la transduction de signaux entraînant notamment l'activation des intégrines leucocytaires favorisant l'adhésion des cellules à l'endothélium.

Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) ont un rôle important dans la mise en place de l'immunité innée au niveau des muqueuses intestinales et respiratoires. Leur fonction est proche de celle des cellules adaptatives T *helper*. Elles répondent à chaque signal perturbateur, pathogène ou bénin, microbien ou non. Elles ont pour caractéristique d'être dépourvues de récepteurs spécifiques aux antigènes et n'ont pas d'étape d'activation ou de sélection clonale. Leurs fonctions effectrices sont assurées *via* les facteurs de transcription qu'elles produisent et les cytokines libérées par les cellules environnantes. Elles sont divisées en trois groupes en fonction des molécules qu'elles secrètent (*Pour revue* Cherrier, 2014; Spits et al., 2013) :

- Les ILCs 1 regroupent les cellules *Natural Killer* et les sous-populations non cytotoxiques dépendantes du facteur de transcription T-bet. Leur caractéristique principale est la production d'IFN $\gamma$ , comme leurs homologues adaptatifs T CD4, dits *helper* 1. Elles ont surtout un rôle dans les réponses antivirale et antitumorale.
- Les ILCs 2 sont principalement productrices de cytokines de type Th2 : IL-13 IL-5 et IL-4 et présentent le facteur de transcription GATA-3. Leur rôle est important dans la réponse antiparasitaire et la stimulation de la production de mucus. Ces cellules ont également un rôle dans l'inflammation pulmonaire.
- Les ILCs 3 sont impliquées dans la réponse innée contre le microbiote, elles expriment ROR $\gamma$ t (*RAR-related orphan receptor gamma t*) et le récepteur à l'IL-23 et secrètent les IL-17 et IL-22. Elles sont divisées en trois sous-groupes : les LTI (*lymphoid tissue inducer cells*), importantes dans la formation des organes lymphoïdes secondaires ; les cellules NK22, productrices d'IL-22 qui protègent l'intégrité de la barrière intestinale ; les ILC3, productrices d'IFN $\gamma$  pouvant influencer la réponse immune adaptative puisqu'elles expriment le CMH II et sont capables de présenter l'antigène, limitant ainsi les réponses contre le microbiote intestinal.

Les mastocytes sont des cellules de l'immunité innée faisant partie des globules blancs, produites au niveau de la moelle osseuse, présentes dans les tissus conjonctifs et les muqueuses. Leur caractéristique principale est d'exprimer à leur surface le récepteur de haute affinité des IgE, qui reconnaît les complexes IgE-allergène même immatures et conduit à la dégranulation des mastocytes (Rivera et al., 2008). Ces cellules ont un rôle important dans l'hypersensibilité.

## 2. La reconnaissance des antigènes microbiens

Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense non-spécifique, il permet la reconnaissance entre les micro-organismes pathogènes et commensaux. Ces micro-organismes présentent des motifs moléculaires conservés appelés PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) ou MAMP (*microbial-associated molecular patterns*) pouvant être reconnus par des récepteurs de l'immunité innée nommés PRR (*pattern recognition receptors*). Ils peuvent également reconnaître des signaux de danger non microbiens appelés DAMP (*damage-associated molecular patterns*). Un nouveau concept propose également la reconnaissance de signaux capables de détecter des perturbations de l'homéostasie, ce sont les HAMPs (*Homeostasis-altering molecular processes*) (*Pour revue Liston and Masters, 2017*). Ces récepteurs de l'immunité innée sont exprimés par les entérocytes et des cellules immunes présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques ou les macrophages, au niveau membranaire ou intra-cytoplasmique (Kumar et al., 2011; Santaolalla and Abreu, 2012; Spasova and Surh, 2014). Ils sont divisés en 4 grandes classes de récepteurs (Takeuchi and Akira, 2010) :

- les TLR (*Toll like receptor*) ; il existe à ce jour 10 TLR connus chez l'être humain et 12 chez la souris
- les NLR (*Nucleotide oligomerisation domain like receptor*) ; il y en a 22 chez l'Homme, les plus décrits étant les récepteurs NOD1 et NOD2 qui reconnaissent respectivement des fragments du peptidoglycane des bactéries à Gram négatif et positif (Philpott et al., 2014)
- les RLR (*Retinoic acid inducible gene 1 like receptor*) ; ils reconnaissent surtout les ARN double brins viraux
- les CLR (lectines de type C) capables de reconnaître une grande variété de ligands, impliqués notamment dans l'adhésion : comme par exemple DC-SIGN qui reconnaît des ligands comprenant des mannoses ou fucoses.

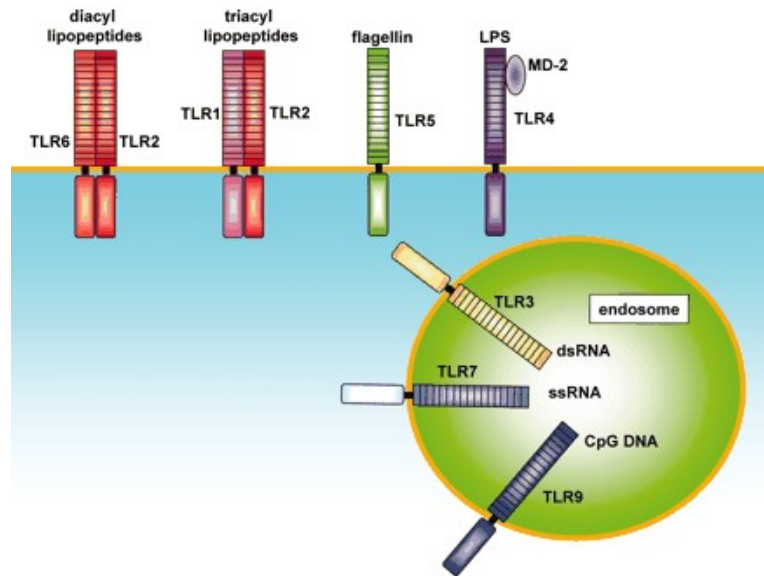
Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire riches en leucines (domaine LRR, *Leucine-rich repeat*) capable de reconnaître le ligand et d'un domaine cytoplasmique (domaine TIR, *Toll/IL-1R interaction domain*) permettant la transduction du signal (Janeway and Medzhitov, 2002). Ils sont fonctionnels sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères, avec une reconnaissance spécifique de motifs microbiens et de réponse associée (Akira, 2006) (Tableau 1, Figure 7).

Récepteurs	Co-récepteurs	Ligand	Origine (Ligand)	Localisation
TLR1/TLR2	CD14	Lipopeptides triacylés	Bactéries à Gram négatif	Membranaire
TLR2/TLR6	CD14 CD36	Lipopeptides triacylés, zymosan	Bactéries à Gram positif, champignon	Membranaire
TLR2	CD14	Lipoarabinomannane, LPS, Peptidoglycane	Mycobactéries	Membranaire
TLR3	ND	ARN double brin	Virus	Endosome
TLR4	CD14 MD2	LPS, protéines virales	Bactéries à Gram négatif, virus	Membranaire
TLR5	ND	Flagelline	Bactéries	Membranaire
TLR7	ND	ARN simple brin, imidazoquinolines	Virus	Endosome
TLR8	ND	ARN simple brin, imidazoquinolines	Virus	Endosome
TLR9	ND	ADN CpG non méthylé	Bactéries	Endosome
TLR10	ND	ND	ND	Membranaire
TLR11	ND	ND, molécule de type profiline	Bactéries uropathogènes <i>Toxoplasma gondii</i>	Membranaire

**Tableau 1 : Les TLR et leurs agonistes.** La localisation des TLR est différente selon la nature de leurs ligands. Les TLR1, 2, 4, 6 et 11 sont présents à la surface des cellules et reconnaissent des MAMPs généralement présents à la surface des microorganismes ou libérés par ces derniers, tels que le lipopolysaccharide (LPS) reconnu par le TLR4, la flagelline reconnue par le TLR5, les acides lipoteichoïques (LTA) et le peptidoglycane reconnus par les hétérodimères TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6. D'autres TLR sont exprimés à la surface des membranes plasmiques des endosomes ou du réticulum endoplasmique et reconnaissent des acides nucléiques, tels que TLR3, 7, 8 et 9.

ND : non déterminé





**Figure 7 : Localisation des TLR.** Les TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont associés à la membrane extracellulaire, tandis que les TLR3, 7 et 9 sont retrouvés à la surface des membranes d'organites intra-cellulaires tels que les endosomes ou les lysosomes (Takeda and Akira, 2005).

Après reconnaissance de leurs agonistes respectifs, les TLR déclenchent différentes cascades de signalisation, nécessitant le recrutement de molécules adaptatrices, telles que MyD88 (*Myeloid differentiation 88*) ou encore TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ), conduisant à l'activation de gènes impliqués dans la défense de l'hôte, tels que des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, ...), des chimiokines (CXCL8, CXCL2 ...), des molécules anti-microbiennes (défensines, lipocaline2, ...) et des molécules de réparation cellulaire (métalloprotéases, facteurs de croissances, cytochromes, ...).

Cinq adaptateurs du domaine TIR ont été décrits (*Pour revue O'Neill and Bowie, 2007*), les voies les plus décrites sont la voie dépendante de MyD88 et la voie dépendante de TRIF. MyD88 est l'adaptateur recruté par tous les TLR sauf le TLR3, qui utilise l'adaptateur TRIF. Très brièvement, le recrutement des adaptateurs induit des phosphorylations en cascade jusqu'à la phosphorylation et la dégradation de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  (*Inhibitor of NF- $\kappa$ B  $\alpha$* ). Cette protéine non phosphorylée séquestre le NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme et le rend ainsi inactif. La cascade d'induction libère donc le NF- $\kappa$ B qui transloque dans le noyau et induit l'expression des gènes pro-inflammatoires. Les TLR activés par des virus recrutent l'adaptateur TRIF et conduisent de la même manière à la production d'interféron de type 1 (IFN- $\alpha$  et  $\beta$ ) *via* la phosphorylation de IRF-3 et IRF-7 (*Interferon regulatory factor*).

Les NLR sont des récepteurs intra-cellulaires retrouvés directement dans le cytoplasme, possédant un domaine NOD très conservé. Ils sont exprimés dans les cellules immunitaires et épithéliales. Les NLR sont composés :

- d'un domaine LRR permettant la reconnaissance des MAMP comme pour les TLR
- d'un domaine central NOD (*Nucleotide-binding oligomerisation domain*) impliqué dans l'oligomérisation des NLR suite à la reconnaissance de l'agoniste
- d'un domaine CARD (*Caspase-activation and recruitment domain*) ou pyrine (PYD) N-terminal pour le recrutement des caspases. Tous les NLR ne possèdent pas un domaine CARD, mais d'autres domaines permettent la spécificité fonctionnelle de chaque NLR.

La reconnaissance des PAMP par NOD1 et NOD2 initie le recrutement de RICK, qui active NF- $\kappa$ B en phosphorylant et dégradant la protéine I $\kappa$ B $\alpha$ . D'autres membres de la famille de NOD : NLRC4, NLRP1 et NLRP3 sont capables de former un complexe moléculaire appelé l'inflammasome, pouvant conduire à la synthèse de la pro-IL-1 $\beta$ . (Kumar et al., 2011).

Les RLR (RIG-1, MDA5 et LGP2) sont situés dans le cytoplasme et sont impliqués dans la reconnaissance d'ARN viraux conduisant à la production d'Interféron de type I. Ils sont caractérisés par un domaine hélicase capable de lier l'ARN et dotés d'une activité ATPase.

### 3. Les molécules anti-microbiennes

Les peptides anti-microbiens (PAM) sont des éléments clés du système immunitaire inné, produits principalement par les cellules de Paneth et retrouvés dans le mucus. Leur activité est importante dans le contrôle de la composition du microbiote. Selon leur nature, ils peuvent tuer différentes bactéries à Gram positif ou négatif, mais également des champignons ou des virus grâce à la présence de régions hydrophobes et basiques permettant d'établir des liaisons avec les structures bactériennes et de causer la formation de pores dans les membranes microbiennes, conduisant à une perte de l'intégrité cellulaire. La classification actuelle se base sur leur caractère cationique ou non cationique. Parmi les peptides cationiques, on retrouve les cathélicidines (peptides linéaires en hélice  $\alpha$ ) et les défensines (peptides à ponts disulfure formant des feuilletts  $\beta$ ), dont les  $\alpha$ -défensines (nommées cryptidines chez la souris) et  $\beta$ -défensines.

Les cellules de Paneth produisent le lysozyme (qui cible surtout les bactéries Gram positif), la phospholipase A2, l'angiogénine 4 et les lectines (Clevers and Bevins, 2013; Nakamura et

al., 2016). Les PAM  $\beta$ -défensines et cathélicidines sont produits par les entérocytes de la barrière et excrétés dans le mucus (Salzman, 2010; Salzman et al., 2010). Les protéines de type C-lectin, telles que Reg3 $\beta$  et  $\gamma$  (*Regenerating islet-derived*) sont capables d'exercer des activités bactéricides. Reg3 $\gamma$  permet d'éliminer spécifiquement les bactéries à Gram positif en se liant au peptidoglycane. Il est induit par le microbiote par l'intermédiaire des TLR.

## **B. L'immunité adaptative**

Comme décrit précédemment, l'épithélium intestinal est associé au GALT, premier système immunitaire qui discrimine les antigènes alimentaires et le microbiote de la lumière intestinale, des antigènes pathogènes. Comme décrit dans la partie A, la réponse innée se met en place très rapidement de manière non spécifique. La défense est dite « à large spectre », elle est essentielle pour la mise en place de l'immunité adaptative, plus spécifique et caractérisée par la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T et B, permettant ainsi l'élimination de l'agent déstabilisant et la mise en place d'une mémoire spécifique du pathogène rencontré.

### **1. Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques (DC) servent de lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Elles sont les sentinelles de l'organisme, elles migrent des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les antigènes aux lymphocytes T (*Pour revue*, Banchereau et al., 2000). Le déplacement des DC est continu, il est observé à l'état basal comme en condition inflammatoire. Dans l'intestin les DC font ainsi le trajet entre l'épithélium intestinal et les ganglions mésentériques (MLN) pour présenter les antigènes alimentaires et de ce fait maintenir la tolérance (Worbs et al., 2006).

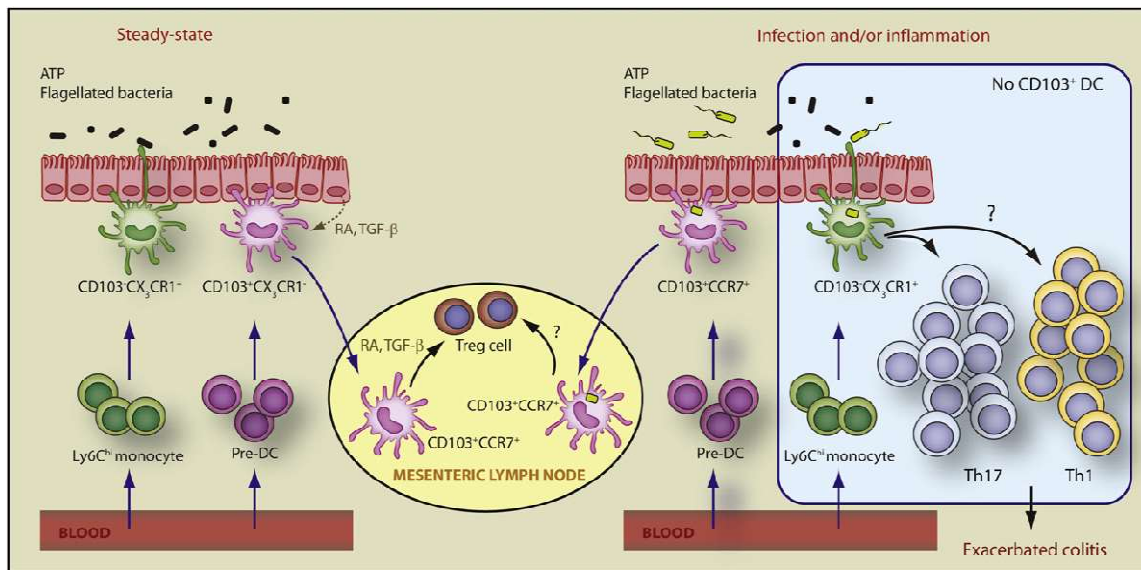
Les DC immatures sont capables d'endocyter et de phagocyter les antigènes et sont caractérisées par une faible expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et des molécules de co-stimulation. Elles sont localisées dans les tissus périphériques et la muqueuse, de manière sous-jacente aux cellules épithéliales. Elles peuvent même envoyer des prolongements (dendrites) vers la lumière pour capturer des antigènes (*Pour revue* Rescigno, 2015).

Lorsqu'une DC reconnaît un antigène, elle va produire des cytokines et permettre le recrutement de neutrophiles, monocytes/macrophages et cellules *Natural Killer*. Selon le type d'antigène, elle produira différents types de cytokines permettant d'orienter l'immunité vers des réponses de type régulatrice, Th1, Th17 ou Th2 (*cf* partie 2. b. ci-après).

Plusieurs sous-populations de DC sont retrouvées dans la muqueuse intestinale. Elles présentent chacune leurs propres marqueurs de surface et possèdent une distribution tissulaire différente selon leur fonction. Deux grands types sont retrouvés : les DC conventionnelles et les DC plasmacytoïdes.

Les DC conventionnelles sont les cellules migratoires. Elles vont migrer vers les ganglions suite à un stimulus. Il existe plusieurs sous-types, en fonction de leur localisation tissulaire (muqueuse intestinale, plaques de Peyer, ganglions mésentériques) mais ils ne seront pas décrits ici ; néanmoins dans la muqueuse par exemple, les DC de phénotype CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> permettent le maintien de l'homéostasie grâce à la production de TGF- $\beta$  et d'acide rétinoïque, induisant la différenciation des cellules T en T régulateurs ayant la capacité d'activer la production d'IgA (Mora and Andrian, 2008; Sun et al., 2015). Les DC CD103<sup>-</sup> peuvent être subdivisées en deux groupes, celles qui expriment CX3CR1 et participent au développement d'une réponse de type Th17 (Atarashi et al., 2008) et celles qui expriment le TLR 5 et conduisent à la fois à la différenciation des Th17 et à la commutation des cellules B productrices d'IgA (Uematsu et al., 2008).

Ces cellules semblent toutes dérivées d'un précurseur commun pour les macrophages et les DC : la lignée myéloïde MDP (*Macrophage Dendritic cell Precursor*) (Bogunovic et al., 2009; Varol et al., 2009) (Figure 8).



**Figure 8 : Origine et différentes fonctions des cellules dendritiques de la *Lamina propria*.**

Les précurseurs provenant du sang vont migrer vers la LP et se différencier, soit à partir de monocytes de type Ly6C<sup>hi</sup> en DC CD103<sup>-</sup> CX3CR1<sup>+</sup> qui vont favoriser une réponse de type Th17 ou Th1, soit à partir de pré-DC pour conduire aux DC CD103<sup>+</sup> capables d'induire préférentiellement des réponses de type T régulatrices (Rescigno, 2009).

Les DC plasmacytoïdes sont caractérisées par une production d'IFN de type 1 (réponse anti-virale) et expriment les TLR 7 et 9. Elles présentent les marqueurs de surface CD11b, CD11c et CD8α. Après activation elles sont capables de se différencier en DC conventionnelles.

## 2. Les lymphocytes T et B

Les antigènes ayant passé la barrière sont donc soit détruit par phagocytose par les macrophages, soit présentés aux lymphocytes par les DC. Deux réponses peuvent être déclenchées : la réponse humorale *via* les lymphocytes B, ou la réponse cellulaire par les lymphocytes T.

### a. Les lymphocytes B et la réponse humorale

Les lymphocytes B sont des producteurs d'Immunoglobulines (Ig). Les lymphocytes B immatures produisent des IgM. Sous l'action de l'IL-10 ou du TGF-β secrétés par les DC, ils vont se différencier en plasmocytes et produire des IgA. Les IgA sont très présentes dans la muqueuse intestinale et jouent un rôle important dans la défense anti-microbienne. La

production d'IgA de la muqueuse intestinale est dépendante de la colonisation par le microbiote (*Pour revue Macpherson and Harris, 2004*).

### **b. La réponse cellulaire T**

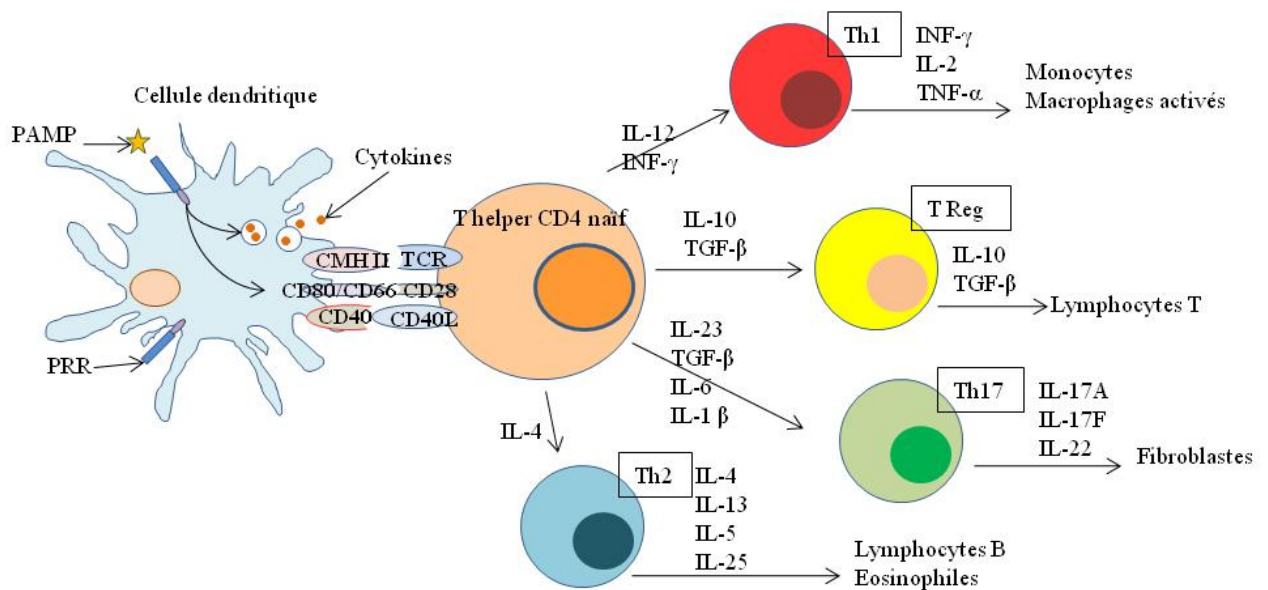
Les lymphocytes présents dans la muqueuse intestinale sont des lymphocytes conventionnels exprimant un récepteur à l'antigène (TCR)  $\alpha\beta$  et soit le CD4 (Lymphocytes T auxiliaires ou helper T CD4<sup>+</sup>), soit le CD8 caractéristique de lymphocytes T cytotoxiques. Les T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>) ont la capacité de détruire les cellules portant un antigène du non-soi. Au niveau de l'intestin, des lymphocytes T non conventionnels sont également retrouvés. Ils se différencient des T conventionnels de par leur TCR  $\gamma\delta$  sans expression des co-récepteurs CD4 ou CD8. Ils possèdent des fonctions de réponses immunes innée et adaptative. Les agents pathogènes sont capables de les activer, mais aussi les cellules cancéreuses.

Les T helper (CD4<sup>+</sup>) produisent des cytokines ayant pour rôle le recrutement cellulaire. Au niveau des plaques de Peyer, ils sont naïfs, c'est-à-dire de type « Th0 ». Selon l'antigène présenté, l'activation par les cytokines ou les molécules de co-stimulation, ils vont se différencier en type Th1, Th2, Th17 ou Th22 (Corthay, 2009; Sun et al., 2015; Zhu and Paul, 2010) et sécréter différents types de cytokines ayant un rôle de recrutement ou de différenciation cellulaire :

- les cellules de type Th1 sont induites par l'IL-12, elles ont essentiellement un rôle dans la médiation cellulaire et l'élimination de pathogènes bactériens et viraux par la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$
- les cellules de type Th2 induites par l'IL-4 sont elles orientées vers la médiation humorale (IL-4, IL-5 et IL-10) et la production d'immunoglobulines IgE impliquées dans la réponse allergique
- les types Th17 produisent majoritairement l'IL-17A et F, l'IL-22 et de l'IL-21 et sont impliqués dans la réponse contre les bactéries et les champignons
- les types Th22 jouent principalement un rôle dans l'induction de la réponse innée, l'IL-22 faisant partie de la même superfamille que l'IL-10.

Certains lymphocytes T sont capables de moduler les réponses Th1 et Th2. Les T régulateurs naturels (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) ont un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie et de la tolérance, en produisant principalement de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , essentiels pour la sécrétion des IgA par les lymphocytes B. Des lymphocytes T régulateurs

induits sont également retrouvés : les Tr1 produisant de l'IL-10 et les Th3 produisant du TGF- $\beta$ .



**Figure 9 : Polarisation des lymphocytes T naïfs.** Après activation par les cellules dendritiques, les lymphocytes T peuvent se différencier en 4 types de lymphocytes T helper, les Th1, les Th2, les Th17 ou les T Reg, en fonction des différents types de co-stimulation et de cocktails cytokiniques présents dans l'environnement.

### III. Les fonctions métaboliques du tube digestif

#### A. L'absorption intestinale

Le rôle nutritionnel est la fonction principale de l'intestin, il se fait par de la digestion et l'absorption des aliments. La digestion correspond à la dégradation des aliments et démarre dans l'estomac par des actions mécanique et enzymatique (sucs digestifs), puis se poursuit dans le duodénum par la libération des sucs pancréatiques et hépatiques. Ces deux actions vont permettre de réduire la taille et le poids moléculaire des aliments par l'intermédiaire de phénomènes d'hydrolyse. Le transport des nutriments à travers les villosités correspond au phénomène d'absorption, il peut être paracellulaire ou transcellulaire.

#### 1. Le passage transcellulaire

Le passage transcellulaire permet le transport de molécules de haut poids moléculaire (supérieur à 600 Da), comme des bactéries ou des antigènes alimentaires. Les bactéries et

antigènes associés passent préférentiellement par les cellules M présentes au niveau des plaques de Peyer ; le mucus y étant moins abondant, elles sont en contact direct avec la lumière intestinale et donc proches des cellules présentatrices d'antigène siégeant dans la *lamina propria*. Ce type de passage s'effectue par endocytose au niveau apical des cellules et exocytose au niveau basal. Les antigènes subissent une transcytose durant leur passage à travers le cytoplasme de la cellule : par exemple, les antigènes alimentaires sont dégradés par les lysosomes pour pouvoir être excrétés au niveau basal sous forme de peptides immunogènes, d'acides aminés totalement dégradés ou d'antigènes intacts.

Le passage transcellulaire peut également être assuré par la phagocytose. Ce type de mécanisme est utilisé pour le transport du pôle basal au pôle apical des IgA sécrétoires qui nécessitent le récepteur polymérique pIgR pour être excrétées dans la lumière intestinale.

## 2. Le passage paracellulaire

Comme décrit précédemment dans la partie I.B.2., les cellules de l'épithélium sont liées entre elles par des jonctions serrées et communicantes (les jonctions gap). Les jonctions communicantes permettent le passage de cytoplasme entre des cellules accolées. Les jonctions serrées quant à elle vont réguler la perméabilité paracellulaire et discriminer les molécules pouvant passer par cette voie selon leur taille (*Pour revue* Nusrat et al., 2000). Ces jonctions serrées, comme décrit précédemment, sont formées de protéines transmembranaires, les claudines, les occludines et les JAM et de protéines intracellulaires ZO-1 et ZO-2 qui lient ces complexes à l'actine du cytosquelette.

Les claudines jouent un rôle essentiel dans la sélection du passage des petites molécules ou des ions au travers des jonctions serrées. Avec leurs domaines extracellulaires, elles forment des pores dont le diamètre sera déterminant pour le passage de ces molécules (*Pour revue* Lal-Nag and Morin, 2009). En condition physiologique, seules les molécules ayant une taille comprise entre 4 et 9 Å peuvent traverser l'épithélium au niveau des villosités alors que celles entre 50 et 60 Å doivent passer au niveau des cryptes (Fihn et al., 2000). Cette voie est utilisée par les petites molécules qui ne peuvent pas traverser la barrière de façon passive. Un défaut ou une perte de certaines protéines de jonction (hyperperméabilité), permet alors le passage de molécules de plus grand poids moléculaire entre les cellules de l'épithélium. Les jonctions serrées sont aussi contrôlées par la phosphorylation de la chaîne légère de myosine sur laquelle l'actine se fixe ; cette phosphorylation induit une contraction du cytosquelette et conduit à l'ouverture des jonctions serrées (Moriez et al., 2005).



## B. Homéostasie glucidique et lipidique

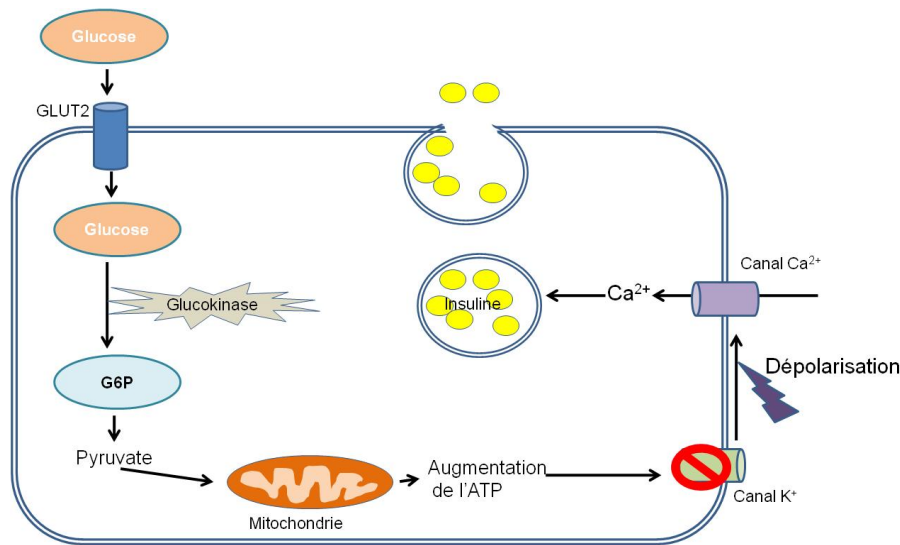
### 1. L'homéostasie glucidique

Le glucose est la première source d'énergie des cellules. Il est absorbé lors des périodes postprandiales par le duodénum. Il se retrouve alors en excès dans la circulation sanguine avant d'être stocké sous forme de glycogène dans le foie et les muscles pour être rapidement utilisé lors d'un effort physique ou d'une période de jeûne. L'homéostasie glucidique est régulée de manière très précise, notamment par l'insuline, pour maintenir une glycémie entre 0,8 et 1,2 g/L. Au dessus ou en dessous de cette concentration physiologique pour l'organisme, on parle respectivement d'hyperglycémie ou d'hypoglycémie.

Les cellules  $\beta$  du pancréas produisent l'insuline en réponse à l'augmentation du taux de glucose dans le sang, permettant ainsi que le taux de glucose reste stable durant la journée. L'insuline favorise la capture et le métabolisme du glucose par le tissu adipeux et les muscles et inhibe la gluconéogenèse et glycogénolyse hépatique. Les adipocytes possèdent des récepteurs à l'insuline et aux hormones de croissance noradrénaline et glucocorticoïde. Lorsque le glucose est limitant, le tissu adipeux libère des acides gras utilisés par les autres organes. Lorsque le taux d'insuline diminue, la concentration de glucagon augmente, ainsi que celles de l'adrénaline et des corticostéroïdes, ce qui stimule la production de glucose hépatique. Le cerveau coordonne ces effets grâce à la détection du glucose. Les adipocytes jouent également un rôle : ils sont capables de réagir à des cytokines hypoglycémiantes (leptine, adiponectine) et à des cytokines hyperglycémiantes (résistine, IL-6 TNF- $\alpha$ ) (*Pour revue* Herman and Kahn, 2006; Rosen and Spiegelman, 2006; Tirone and Brunicardi, 2001).

Lorsque le glucose est détecté par les cellules bêta du pancréas, il est pris en charge par des transporteurs du glucose, les GLUT (*glucose transporteur*), en particulier le GLUT2. Sa transformation en glucose 6 phosphate (G6P) par la glucokinase (GK) puis sa métabolisation en pyruvate déclenche la sécrétion d'insuline. La voie de glycolyse utilisée pour la transformation du G6P en pyruvate génère de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), ce qui ferme les canaux ioniques potassiques ( $K^+$ ) du pancréas, sensibles à l'ATP (*Pour revue* Ashcroft, 2006). La membrane cellulaire va subir une dépolarisation, ce qui active l'ouverture des canaux calciques ( $Ca^{2+}$ ). Un flux de calcium va alors entrer dans la cellule et entraîner l'exocytose des granules d'insuline dans le sang (*Pour revue* Fryirs et al., 2009) (Figure 10). L'insuline, étant une hormone hypoglycémiante, agit sur ses tissus cibles

(foie, muscle, tissus adipeux) et induit la clairance systémique du glucose, soit en glycogène soit en triglycéride via les récepteurs IRS (*insulin receptor substrate*).



**Figure 10 : Schéma récapitulatif de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas.**

D'autres transporteurs du glucose sont utilisés par le glucose, les transporteurs sodium-glucose dépendant, SGLT1 et 2 (*Sodium/Glucose coTransporteur 1 et 2*), présents respectivement dans la muqueuse intestinale et le rein. Le rôle principal de SGLT2 est la réabsorption/excrétion du glucose au niveau du rein. L'inhibition de SGLT1 augmente la sécrétion du GLP-1 et du PYY suite à une augmentation du glucose, déclenchant l'effet incrétine (*cf* partie C) (Shibazaki et al., 2012).

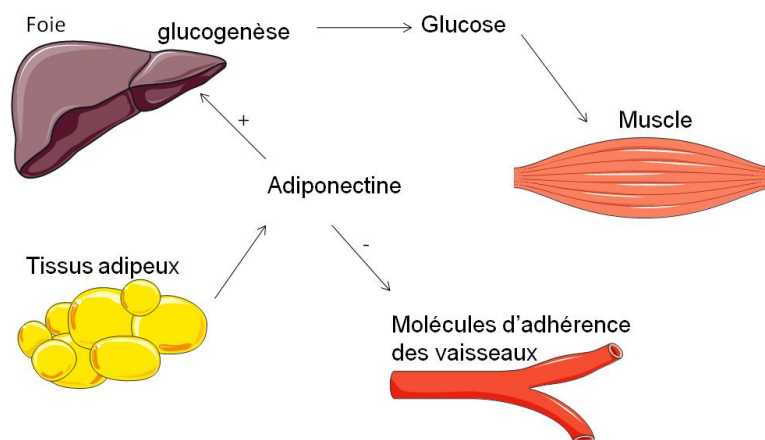
Lorsque l'organisme est en hypoglycémie, la glycogénolyse est déclenchée afin d'augmenter le taux de glucose dans le sang à partir des stocks de glycogène. Pour cela, les îlots de Langerhans sécrètent du glucagon. Son organe cible est le foie, dans lequel il a pour fonction d'activer la glycogénolyse et la néoglucogenèse. En condition hyperglycémique, le glucose est métabolisé dans le foie en acides gras qui sont ensuite stockés dans les adipocytes sous forme de gouttelettes lipidiques renfermant les triglycérides, suivant la voie de la lipogenèse *de novo* (Large et al., 2004).

Le tissu adipeux (blanc uniquement) joue un rôle très important dans la régulation de la balance énergétique par l'intermédiaire de la sécrétion d'hormones appelées adipokines. La leptine et l'adiponectine sont les deux hormones ayant un effet sur le métabolisme et la balance énergétique les plus décrites et les plus importantes. Elles ont un rôle dans l'oxydation des acides gras *via* l'activation de l'enzyme AMP-kinase activée (AMPK), ce qui augmente

également le transport du glucose dans le muscle (Minokoshi and Kahn, 2003). Le sport, entre autres, active l'AMPK et donc augmente l'oxydation des graisses et réduit la résistance à l'insuline (*Pour revue* Ruderman and Prentki, 2004).

La leptine a un rôle important dans la modulation de l'obésité (Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995). Elle a une fonction anorexigène et est sécrétée principalement par le tissu adipeux et son récepteur est situé dans l'hypothalamus (Lee et al., 1996). Elle inhibe les voies orexigènes (NPY et AgRP) et active les voies anorexigènes (POMC cocaïne, CART), régulant ainsi la prise alimentaire. La leptine réduit également le taux des lipides circulants et améliore la sensibilité à l'insuline dans le foie : l'insuline active la production de leptine qui inhibe la production d'insuline (Ollmann et al., 1997, *pour revue* Kieffer and Habener, 2000; Ottaviani et al., 2011; Rosen and Spiegelman, 2006).

L'adiponectine est une hormone qui améliore la sensibilité à l'insuline. Elle circule à des concentrations élevées chez les individus sains. Son niveau est inversement corrélé à la masse corporelle (Scherer et al., 1995). Outre son action sur l'insuline, elle joue un rôle sur la concentration d'acides gras libres, de glucose et de triglycérides (Fruebis et al., 2001) et inhibe le développement de l'athérosclérose (Hotta et al., 2000) (Figure 11).



**Figure 11 : Adiponectine et homéostasie glucidique.** L'adiponectine, produite par le tissu adipeux, joue un rôle dans le taux de glucose nécessaire aux muscles lors d'un effort et est capable d'inhiber les molécules d'adhérence tapissant les parois des vaisseaux.

Le système nerveux est également mis en jeu dans l'homéostasie glucidique, notamment *via* une hormone intestinale sécrétée par les cellules entéro-endocrines L à partir du pro-glucagon, le GLP-1. Sa cible est le nerf vague qui accompagne la veine porte et dont une des fonctions est d'inhiber la sécrétion du glucagon (Burcelin et al., 2008) (*cf* partie C et D).

## 2. Homéostasie lipidique

Les acides gras (AG) de la lumière intestinale proviennent de triglycérides, de phospholipides et d'ester de cholestérol. Ils nécessitent d'être émulsionnés par les acides biliaires (AB) du fait de leur caractère hydrophobe. Plus la concentration de micelles AG-AB est élevée plus les entérocytes les absorberont. À la surface des entérocytes, des pompes à protons créent un gradient de pH qui permet de dissocier les micelles et rend possible le passage transcellulaire passif des AG. A faible concentration, les AG sont transportés par des protéines telles que FABP (*Fatty acid binding protein*) ou le complexe FAT/CD36 capable de transporter plusieurs AG (*Pour revue, Tso et al., 2004*).

Après avoir franchi le pôle apical des entérocytes, les AG sont métabolisés en triglycérides (TG) et phospholipides. Les entérocytes sont capables de stocker de façon transitoire des TG. Après leur passage par le réticulum endoplasmique dans lequel ils se fixent à un transporteur - l'apolipoprotéine A- ces TG forment des chylomicrons, des VLDL ou des petites HDL. Ces vésicules passent dans la voie sanguine, dans laquelle la lipoprotéine lipase (LPL) va les couper. Les AG ainsi formés sont captés par les transporteurs FABP présent dans le tissu adipeux, le foie le cœur et le cerveau.

Le tissu adipeux est un tissu de stockage des AG, il peut produire des AG libres pour les autres tissus périphériques. Le foie est également un tissu de stockage, mais si l'accumulation est excessive cela peut conduire à une stéatose hépatique.

L'homéostasie lipidique et l'homéostasie glucidique sont liées. Pour avoir une glycémie constante le taux d'acides gras circulant doit également être régulé. Les d'AG circulants induisent une augmentation de la sécrétion d'insuline en se liant au récepteur membranaire GPR40 des cellules  $\beta$  du pancréas. L'insuline quant à elle est capable d'inhiber la lipolyse dans le tissu adipeux. Dans le foie, l'insuline se fixe sur son récepteur IRS1, bloquant ainsi la  $\beta$ -oxydation des lipides.

Les AG à chaîne courte (AGCC) présents dans l'intestin, tels que le butyrate, agissent directement sur les cellules nerveuses ou *via* les récepteurs GPR40, 41, 43 et 119 présents à la surface des cellules. Les AG à chaîne longue stimulent préférentiellement la sécrétion de cholécystokinine (CCK) par le GPR40 des cellules entéro-endocrine du duodénum (Lal et al., 2001).

## C. Fonction endocrine

Le tube digestif est le plus gros organe exocrine du corps. Cela commence au niveau des glandes salivaires qui sécrètent la salive. Au niveau de l'estomac sont ensuite produits les sucs gastriques, tandis que les îlots de Langerhans du pancréas produisent les sucs pancréatiques, l'insuline et le glucagon. La vésicule biliaire sécrète les acides et sels biliaires nécessaires au métabolisme des glucides et des lipides. Enfin les cellules entéro-endocrines présentes tout le long de l'épithélium intestinal sont capables de libérer différents types de peptides ou d'hormones.

Il existe plus d'une quinzaine de types de cellules entéro-endocrines capables de produire différentes hormones, comme par exemple les cellules L, K ou encore I.

Les hormones produites peuvent être rangées en grandes familles :

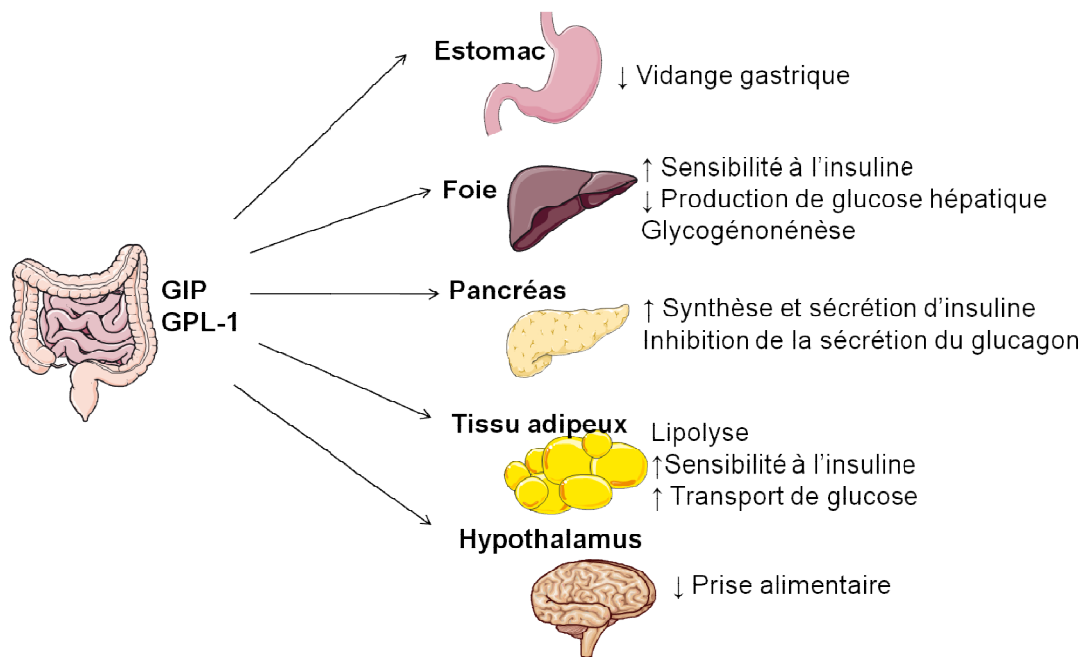
- les insulines
- les sécrétines, par exemple le glucagon
- les gastrines, comprenant la gastrine et la cholécystokinine (CCK)
- les somatostatines
- les peptides comme le peptide tyrosine tyrosine (PYY) ou le neuropeptide Y (NPY)
- les incrétones, telles que GIP et GLP-1

Les incrétones sont des hormones gastro-intestinales libérées en réponse aux nutriments. Elles sont représentées majoritairement par le GLP-1 (*Glucagon Like Peptide 1*) et le GIP (*Glucose-dependent insulinotropic polypeptide*). Ces hormones permettent l'établissement de « l'effet incréto », augmentant ainsi la sécrétion d'insuline en réponse à une consommation orale de glucose, comparativement à celle observée lors d'une administration de glucose faite par voie intraveineuse à la même concentration. Cet effet incréto est un facteur important de la régulation de l'homéostasie glucidique. S'il est défectueux, cela conduit à une diminution de la tolérance au glucose et au développement du diabète de type 2 (Cani et al., 2007a; Miyawaki et al., 1999; Scrocchi et al., 1996).

Le GLP-1 est un peptide de 29 acides aminés, libéré majoritairement au niveau des parties distales de l'intestin et du côlon suite au clivage du pré-proglucagon par les cellules L. Le GIP est un peptide de 42 acides aminés produit principalement par les cellules K du duodénum.

Ces peptides passent dans le sang et sont rapidement inactivés par une enzyme, la DPP-IV (*Dipeptidyl-peptidase IV*).

L'inhibition de la DPP IV par des molécules de la famille des gliptines induit une hausse importante de la concentration de GLP-1 et de GIP et de ce fait une augmentation de la sécrétion d'insuline, améliorant ainsi l'équilibre glucidique. Ces molécules sont actuellement utilisées comme traitement chez le diabétique. Ces incrétines sont capables de jouer un rôle sur la sensibilité à l'insuline et ainsi de moduler le métabolisme glucidique et le métabolisme lipidique. Au niveau du tissu adipeux GIP a principalement pour fonction d'améliorer l'incorporation des TG par les adipocytes *via* le transporteur du glucose GLUT4 grâce à l'insuline et la synthèse des AG (Badman and Flier, 2005), de stimuler la lipolyse (McIntosh et al., 1999) en favorisant la synthèse des AG et leur ré-estérification (Getty-Kaushik et al., 2006) et d'augmenter la synthèse (Kim et al., 2010) et l'activité de la LPL (Kim et al., 2007).



**Figure 12 : Les effets métaboliques du GIP et du GLP-1.** Ces deux hormones incrétines produites au niveau du duodénum permettent la régulation de l'insuline et du glucagon au niveau hépatique et pancréatique, mais également au niveau du tissu adipeux, où elles jouent un rôle dans la régulation lipidique. Au niveau de l'estomac elles sont capables d'inhiber la vidange gastrique et au niveau de l'hypothalamus la prise alimentaire (D'après *Servier Medical Art*).

La CCK est sécrétée au niveau du duodénum et du jéjunum par les cellules I, après stimulation par les lipides et les protéines. L'activation de ses deux récepteurs, CCK1 et

CCK2, situés sur le nerf vague et l'hypothalamus inhibe la prise alimentaire et stimule la libération d'insuline. La CCK est également capable de stimuler la vésicule biliaire, d'augmenter la motricité intestinale et de diminuer l'absorption des sucres (*Pour revue* Badman and Flier, 2005; Capasso and Izzo, 2008).

Le PYY est produit au niveau de l'iléon et du côlon, par les cellules L. GLP-1 et PYY sont tous deux reconnus pour leur effet satiétogène, réduisant l'appétit donc la prise alimentaire, et favorisant la vidange gastrique (Grube, 1986; Gutierrez-Aguilar and Woods, 2011; Hameed et al., 2009; Hand et al., 2012; Jégou et al., 2003; Steinert et al., 2017).

Le GLP-2 est moins connu, son effet le plus décrit porte sur le métabolisme. Il dérive également du pré-proglucagon, et serait capable d'augmenter l'absorption des lipides et la formation des chylomicrons et de favoriser un changement du microbiote en diminuant la perméabilité intestinale (Cani et al., 2008; Hsieh et al., 2009).

La ghréline est un peptide de 28 acides aminés produite et secrétée principalement par l'estomac et l'intestin (Date et al., 2000). Sa production est modulée par l'état énergétique de l'organisme (Ariyasu et al., 2001). La ghréline est capable d'agir au niveau hypothalamique pour induire un effet orexigène (Wren et al., 2000, 2001a, 2001b).

#### **D. Le système nerveux entérique**

Le système nerveux entérique (SNE) est formé par tous les neurones présents dans la paroi du tube digestif. Il y en a environ  $10^8$ , c'est le même nombre de neurones que dans la moelle épinière. Le SNE régule la digestion, l'absorption et la mobilité en coordonnant les mouvements péristaltiques *via* deux plexus : les plexus myentérique et submuqueux. Ces plexus jouent un rôle dans la contraction des feuilletts musculaires impliqués dans le péristaltisme. Ils régulent également les sécrétions intestinales par l'intermédiaire de neurotransmetteurs comme l'acétylcholine, la CCK ou encore le NPY, jouant notamment un rôle dans la satiété. Les neurones composants le SNE sont de plusieurs types, permettant ainsi de proposer un large panel de neurotransmetteurs (*Pour revue* Phillips and Powley, 2007). Certains neurones sont capables de répondre au glucose présent dans la lumière intestinale (Liu et al., 1999). Comme les neurones du cerveau, ceux de l'intestin sont entourés de cellules gliales également aptes à libérer des neurotransmetteurs. Elles ont aussi un rôle important

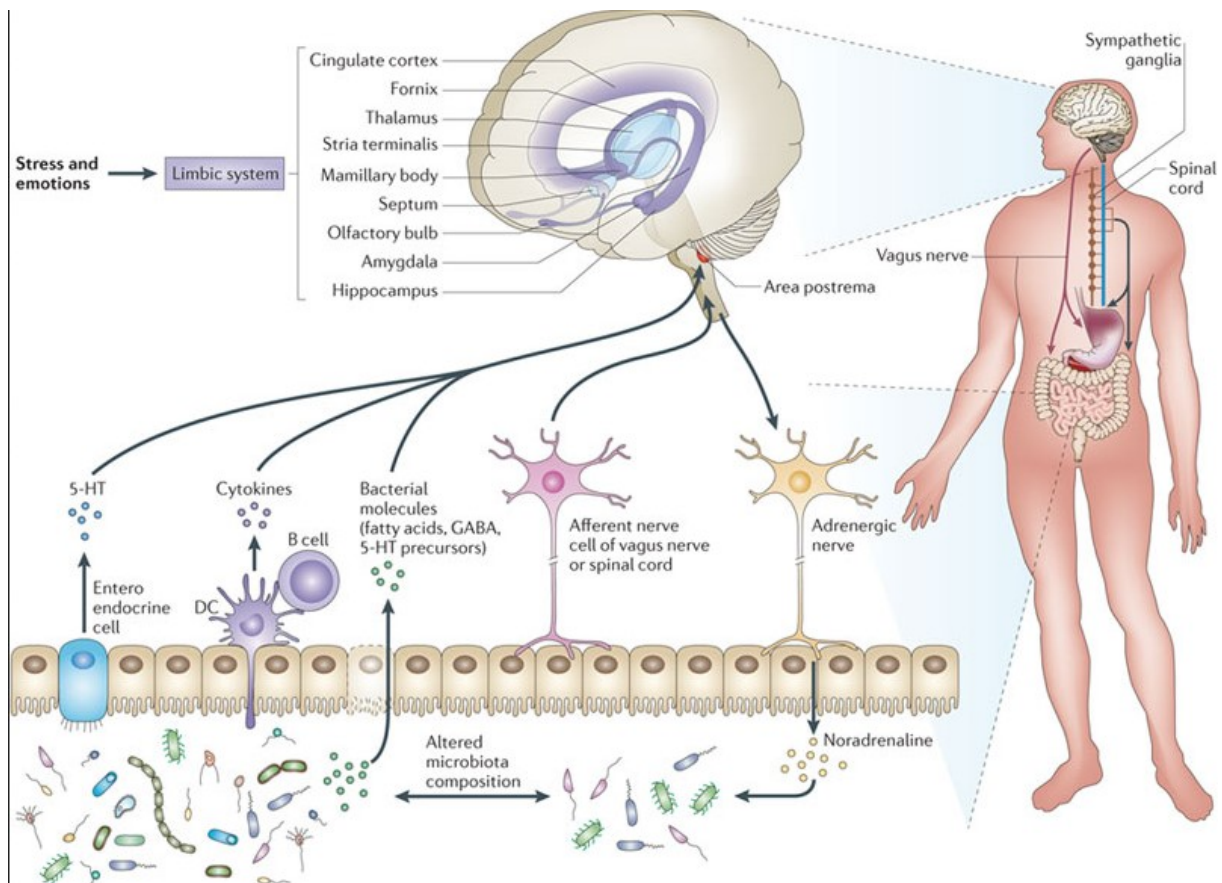
dans la régulation immunitaire de l'intestin car elles peuvent attirer les lymphocytes (*Pour revue Cabarrocas et al., 2003*).

### **E. Relation intestin/cerveau**

L'intestin peut communiquer avec le cerveau *via* les terminaisons du nerf vague présentes dans la muqueuse. Il peut également détecter le taux de glucose présent dans sa lumière, c'est « l'arc reflexe métabolique » (Oomura et al., 1969). Une étude a montré que des senseurs de glucose entériques spécifiques (récepteurs de GLP-1) peuvent induire la stimulation des neurones entériques et hypothalamiques, soulignant ainsi une relation intestin/cerveau (Knauf et al., 2008).

Le glucose est détecté dans la veine porte (Hevener et al., 1997), spécifiquement par le transporteur GLUT2 (Cani et al., 2007a; Thorens, 2009) et régulé par GLP-1 (Burcelin et al., 2001), il entraîne ainsi une activation du nerf vague et plus globalement du SNE. Les peptides sécrétés par l'intestin ont une action sur l'hypothalamus, qui à son tour, sécrète des hormones anorexigènes comme les orexines et leurs récepteurs (Sakurai, 1999), le NPY (Kuo et al., 2007) ou encore la pro-opiomélanocortine (POMC). Les systèmes de communication bidirectionnels neuraux, hormonaux et immunologiques forment l'axe intestin/cerveau (Sam et al., 2012) (Figure 13). Le cerveau peut ainsi influencer la motilité, la sécrétion et la production de mucines et moduler la production de cytokines *via* les cellules du système immunitaire de la muqueuse. Le microbiote, comme nous le verrons ci après, est en lien étroit avec la muqueuse et est ainsi en lien direct avec cet axe intestin-cerveau. Comme nous le décrirons (*cf* chapitre 2 partie III.C.), un déséquilibre du microbiote peut alors avoir de possibles effets sur cet axe, pouvant provoquer des troubles du comportement tels que le stress ou la dépression.





**Figure 13 : L'axe intestin/cerveau/microbiote** Le microbiote a une action sur l'hypothalamus *via* les voies neurale (neurotransmetteurs : dopamine, sérotonine), endocrine (peptides entéro-endocrines), immunologique (cytokines) et métabolique (acides gras à chaînes courtes, GABA *acide  $\gamma$ -aminobutyrique*). Le stress ou les émotions peuvent à l'inverse avoir un effet sur le microbiote par l'intermédiaire d'une production d'hormones ou de neurotransmetteurs du stress qui déséquilibrent la physiologie intestinale et modifient ainsi le microbiote (Collins et al., 2012).

## **Chapitre 2 Le microbiote et les maladies chroniques**

### **I. Le Microbiote**

#### **A. Définition**

Le microbiote, anciennement appelé flore ou microflore, est un écosystème formé de bactéries, de virus, de levures, de champignons et de phages, non pathogène, vivant en symbiose avec l'Homme. La composition du microbiote est variable en fonction des différents sites anatomiques (Hoffmann et al., 2016) et il a ainsi été possible de montrer des différences substantielles selon le niveau auquel le microbiote a été caractérisé :

- cutané (Rodrigues Hoffmann, 2017)
- vaginal (Lepargneur, 2016)
- du tractus génital masculin (Mändar, 2013; Nelson et al., 2016)
- du tractus respiratoire (Krause et al., 2016)
- du tractus gastro-intestinal (GIT)

#### **B. Composition du microbiote intestinal**

Jusqu'à l'apparition des techniques de séquençage haut débit, le microbiote restait une boîte noire, les bactéries cultivables pouvant être les seules identifiables. Nous savons désormais que le microbiote intestinal est composé d'environ  $10^{14}$  bactéries, soit 10 fois plus que le nombre total de cellules du corps humain. Plus de 3,3 millions de gènes ont pu être détectés en analysant le microbiote humain de différentes cohortes (Nielsen et al., 2014; Qin et al., 2010, 2012), dévoilant alors que le microbiome code pour 150 fois plus de gènes que le génome humain. 99% de ces gènes sont d'origine bactérienne, laissant prédire qu'au moins 1000 espèces différentes peuvent être retrouvées au niveau de l'intestin de la population humaine. Chaque individu porte en moyenne 540 000 gènes, ce qui correspond à environ 160 espèces différentes. 60 de ces espèces sont retrouvées chez plus de la moitié des individus, représentant donc la flore dominante (le « core microbien ») (Turnbaugh et al., 2007).

Ce microbiote apporte de nombreuses fonctions supplémentaires à notre organisme et est actuellement considéré comme un organe à part entière. La majorité des bactéries qui le composent sont des bactéries anaérobies strictes, cependant on retrouve également des

bactéries anaérobies facultatives et des bactéries aérobies. Il comprend en outre des archées et quelques eucaryotes, principalement des levures.

Le séquençage ribosomique 16S par l'alignement des unités taxonomiques (OTU) de fèces humain a permis d'établir les grands phyla qui composent le microbiote (Tap et al., 2009) (Figure 14) :

- les *Firmicutes* comprenant notamment les genres *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Staphylococcus* mais aussi *Lactobacillus*
- les *Bacteroidetes* comprenant surtout *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*
- les *Actinobacteria* dominées par les Bifidobacteries
- les *Proteobacteria* dont le genre *Escherichia*
- les *Verrucomicrobia* composées principalement du genre *Akkermansia*

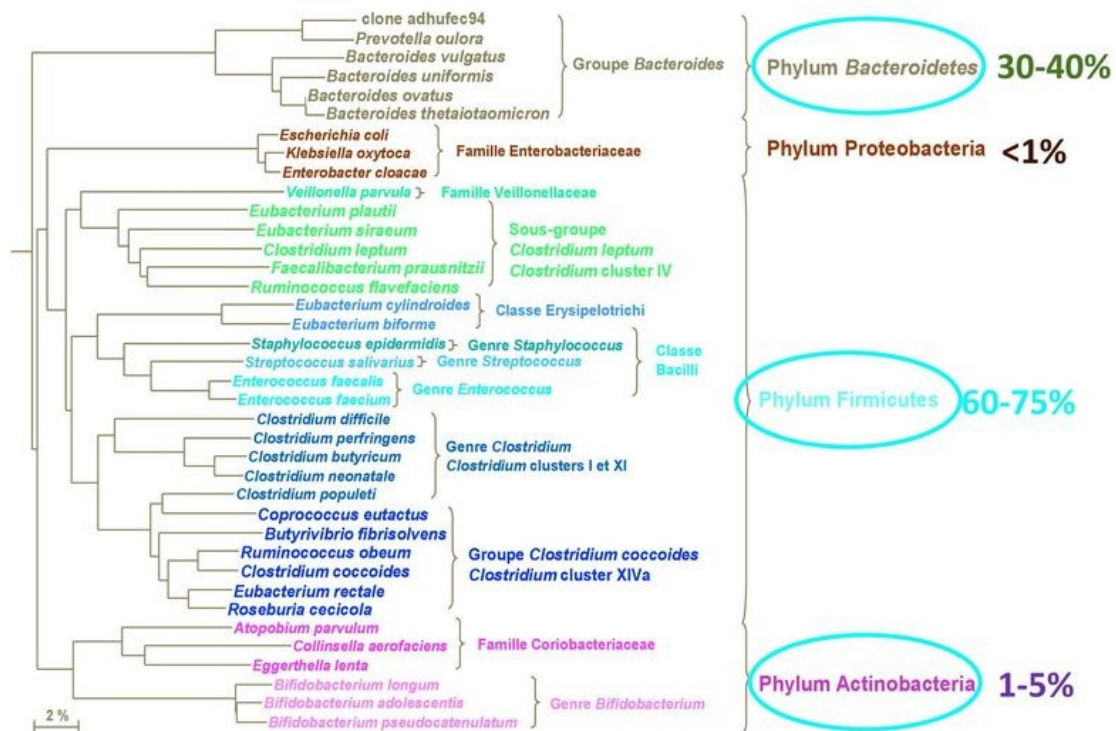
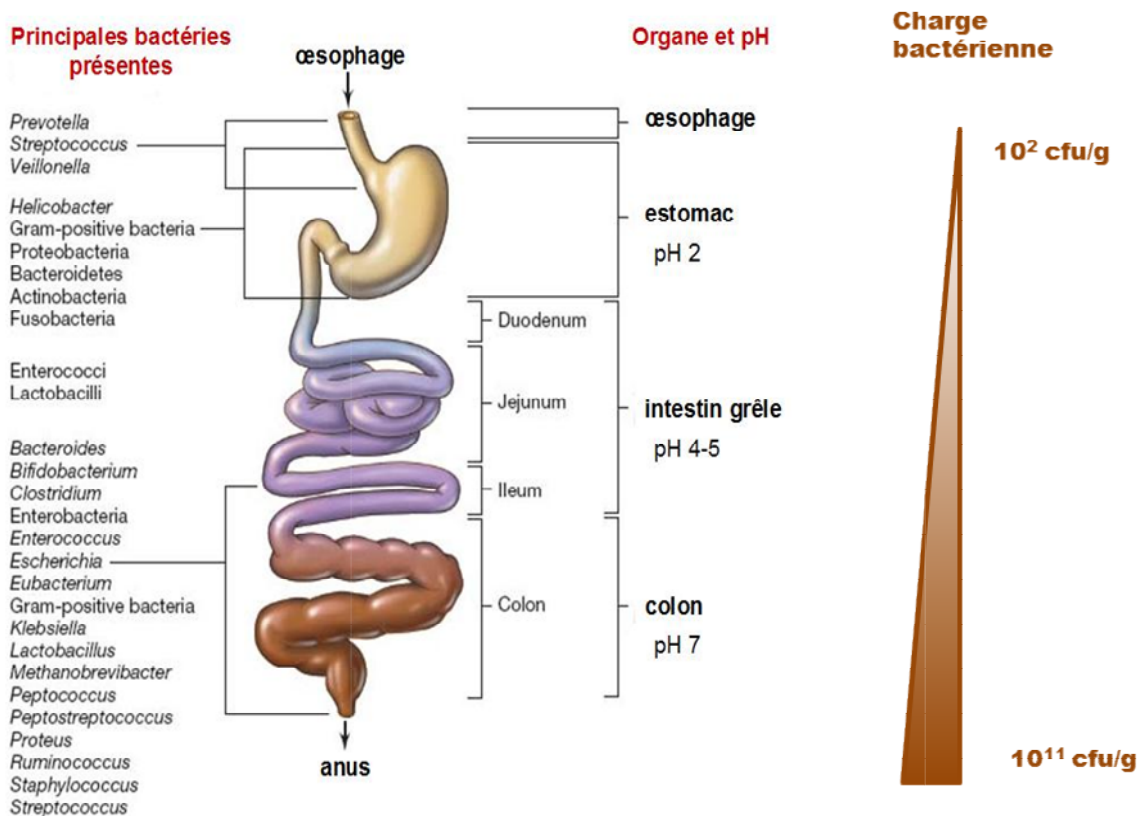


Figure 14 : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique montrant la composition du microbiote intestinal (source : google image).

Les *Bacteroidetes* sont composées essentiellement de bactéries à Gram négatif et les *Firmicutes* de bactéries à Gram positif et représentent les deux groupes majoritaires sur la cinquantaine de phyla décrits à ce jour (Frank et al., 2007). La distribution des espèces est

dépendante de la résistance de celles-ci aux différents niveaux de pH et d'oxygène présents dans le tractus et aux conditions physiques. De ce fait, il existe un gradient de répartition selon lequel les bactéries aérobies/anaérobies facultatives sont retrouvées majoritairement au niveau du duodénum et du jéjunum, les bactéries anaérobies strictes au niveau du côlon (Figure 15) ; la richesse la plus élevée étant au niveau du côlon

La composition du microbiote varie fortement entre les individus, pouvant expliquer les prédispositions à certaines maladies associées aux dysbioses du microbiote (*cf* partie IV).



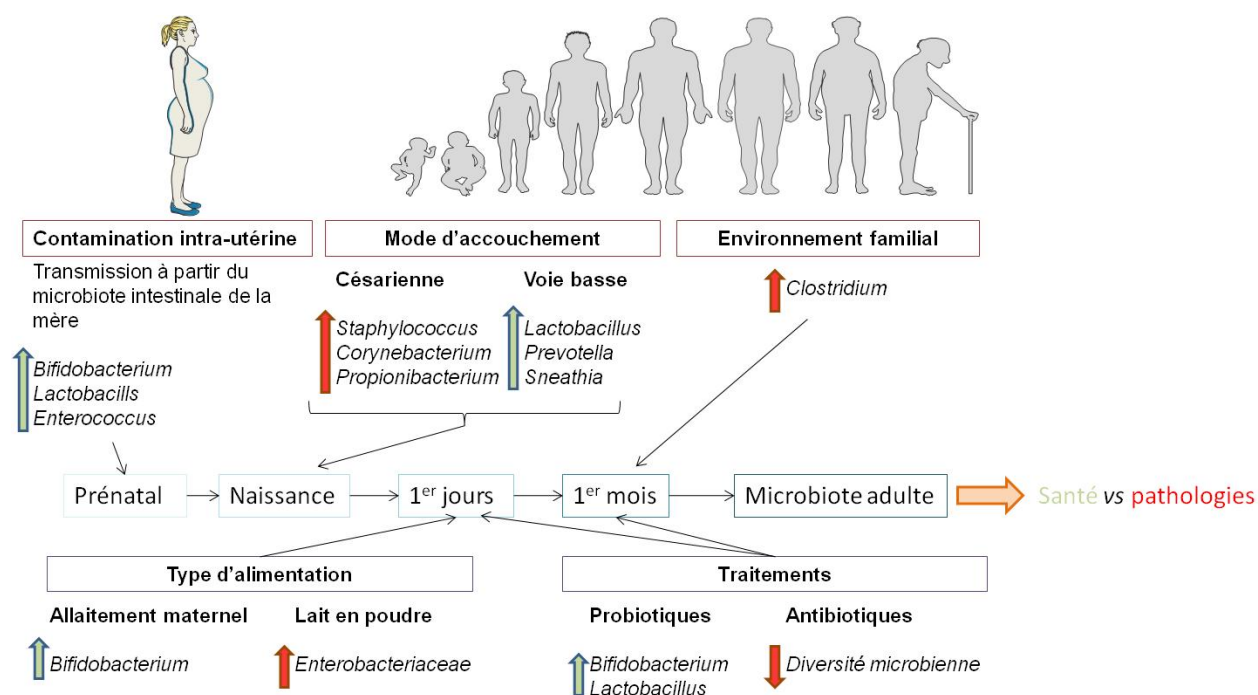
**Figure 15 : Distribution des différentes espèces bactériennes présentes dans le tractus digestif chez l'homme adulte.** (Modifié d'après Madigan et al., 2009).

### C. Implantation du microbiote

L'établissement du microbiote est un phénomène complexe. Même si des études récentes indiquent que le fœtus ne réside pas dans un environnement totalement stérile (Aagaard et al., 2014), la colonisation du tube digestif du nouveau-né par le microbiote ne se met en place qu'à la naissance. Cette colonisation –très précoce à la naissance- est influencée par divers facteurs, tels que le mode d'accouchement, le type d'alimentation du nouveau-né,

l'environnement sanitaire, la prise de traitement. Les enfants nés par voie basse sont principalement colonisés par la flore fécale et vaginale de la mère, alors que chez ceux nés par césarienne, les flores cutanée de la mère et de l'environnement hospitalier sont prédominantes. Le microbiote des nouveaux-nés est au départ caractérisé par une faible diversité microbienne et par la colonisation de bactéries anaérobies facultatives. Les bébés allaités ont une flore plus hétérogène, avec une prédominance de *Bifidobacteria* et de *Staphylococci* ; ceux nourris avec du lait maternisé ont une flore plus homogène (Schwartz et al., 2012), mais cette différence s'atténue dès l'introduction de nourriture mixée. Les antibiothérapies influencent également la composition du microbiote durant la croissance (Campeotto et al., 2007). De façon générale, la composition évolue tout au long du développement. Jusqu'aux 2-3 premières années de vie, le microbiote est dominé par les *Bifidobacterium*, puis sa diversité et sa richesse augmentent jusqu'à atteindre une composition adulte plus complexe mais unique pour chaque individu (Figure 16) (Campeotto et al., 2007; Ottman et al., 2012). Les facteurs périnataux sont donc très importants et influencent fortement la colonisation, donc la composition du microbiote à l'âge adulte qui va rester relativement stable et résiliente chez l'adulte sain.

Le microbiote est susceptible de changer selon les conditions dans lequel il se trouve (infections, traitements, actes chirurgicaux, changement de régime alimentaire), et sa diversité diminue au cours du vieillissement (Biagi et al., 2010).



**Figure 16 : Les facteurs influençant la composition du microbiote.** Dès les premières phases de la vie, le microbiote du fœtus peut être influencé par le mode d'accouchement et d'allaitement, ceci agit sur sa mise en place précoce. Son maintien jusqu'à l'âge adulte est conditionné par l'environnement qui entoure l'être vivant et la prise ou non de traitements pro- ou antibiotiques (*Adapté de Matamoros et al., 2013*).

## II. Méthodes d'analyse

Les premières études de la composition du microbiote ont été réalisées dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle à partir de prélèvements fécaux et étaient basées sur des techniques de culture et d'isolement sur milieu sélectif. Ces techniques présentaient des limites : seules les bactéries cultivables et fortement représentées pouvaient être détectées. Sachant que 60 % des bactéries du microbiote sont anaérobies strictes et sensibles à l'oxygène, il n'était possible d'identifier que 20 à 30 % des bactéries cultivables (Moore and Holdeman, 1974), jusqu'à l'arrivée des méthodes méta-omiques.

Les analyses méta-omiques comprennent le séquençage à haut débit, les analyses des polymorphismes, le transcriptome, le protéome et le métabolome et permettent de caractériser les fonctions et les implications possibles du microbiote sur la santé (Figure 17). Ces études sont plus précises et plus rapides et indépendantes de la culture bactérienne. Elles permettent d'obtenir un instantané moléculaire de la fonction microbienne à un moment donné. Ces outils

ont mis en évidence des fonctions propres au microbiote intestinal et les mécanismes qui y sont associés.

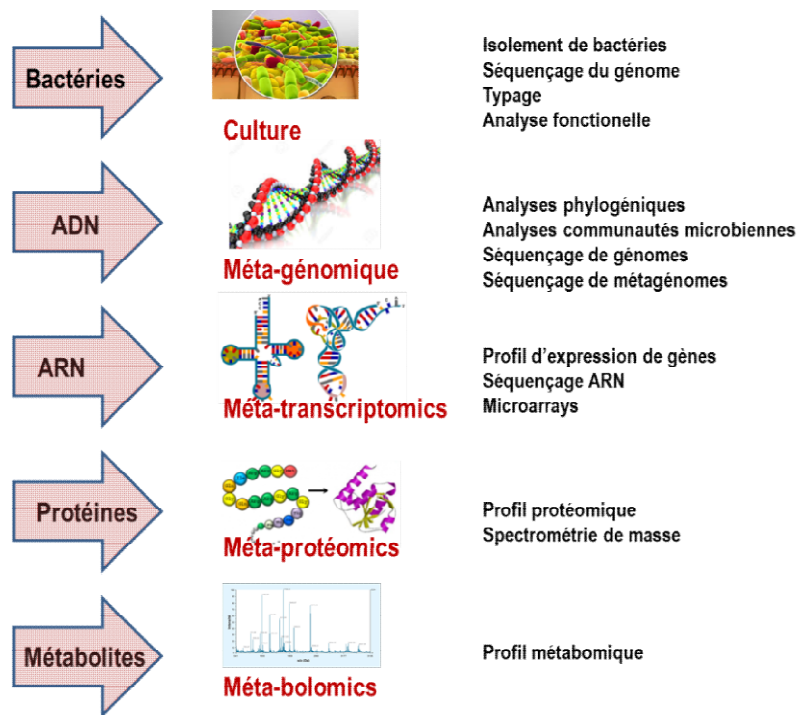


Figure 17 : Les différents niveaux des analyses méta-omiques.

## 1. Le métagénome

La génomique est l'analyse de l'intégralité du matériel génétique d'un individu, d'une espèce ou d'un environnement. Le métagénome du microbiote est donc l'ensemble des gènes des microorganismes du microbiote. Les premières études métagénomiques ont eu lieu en Europe (projet « MetaHIT » coordonné par l'INRA) et aux USA (« Human microbiome project » coordonné par le NIH) (Nielsen et al., 2014). L'ADN total des bactéries du microbiote est extrait puis séquencé à haut débit, les gènes et les fonctions associées sont ainsi obtenus par comparaison d'homologies de séquence (Nielsen et al., 2014; Qin et al., 2010).

L'analyse du microbiote mettant en œuvre le séquençage de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S composé de sous-unités ribosomiques très conservées chez les procaryotes, mais possédant toutefois des régions variables et hypervariables (Suau et al., 1999) est une méthode couramment appliquée à l'étude phylogénétique et taxonomique des bactéries et reste actuellement la moins coûteuse. Les séquences sont groupées en OTU (*operational taxonomic unit*), les bactéries d'une même espèce possédant les mêmes OTU. La métagénomique globale

consiste à fragmenter tous les ADN présents dans l'échantillon avant d'effectuer un séquençage haut débit (shotgun). Les séquences (ou reads) sont ensuite assemblées par analyse bioinformatique afin de reconstruire les génomes des microorganismes.

## **2. Le transcriptome**

La transcriptomique est l'étude des transcrits du génome, c'est-à-dire des ARN messagers (ARNm). Ils sont étudiés par puce à ADN (microarray) ou séquençage ARN (RNAseq). La transcriptomique comprend tous les ARN : les ARNm, les ARN non-codants et les petits ARN.

## **3. Le protéome**

La protéomique est l'étude des protéines. C'est une analyse quantitative et qualitative par spectrométrie de masse réalisée à un temps et dans des conditions donnés. Cela permet de suivre les modifications post-traductionnelles des protéines et ainsi d'évaluer la fonctionnalité du microbiote. Son profil est fortement lié au génome (Petriz and Franco, 2017; Verberkmoes et al., 2009).

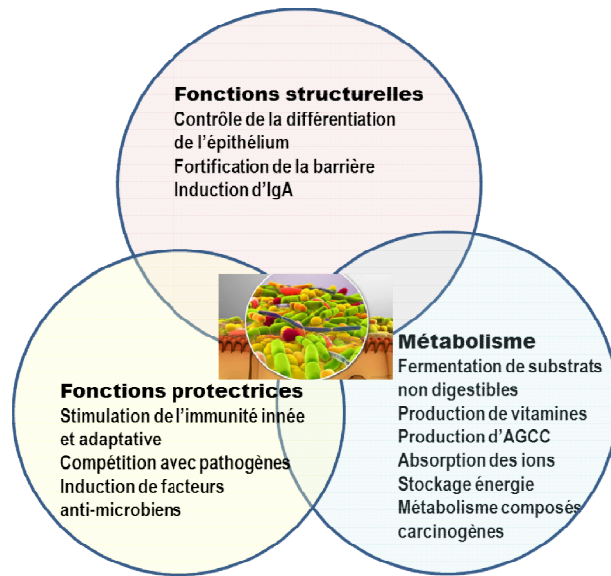
## **4. Le métabolome**

La métabolomique est l'étude des métabolites (sucres, vitamines, acides aminés, acides gras, nucléotides) présents dans un environnement. Elle est réalisée par spectrométrie de masse. C'est le « point terminal » du génome, du transcriptome et du protéome (Petriz and Franco, 2017).

### **III. Rôle du microbiote**

L'écosystème formé du microbiote et de l'épithélium intestinal implique une communication étroite entre ces deux organes. Ce dialogue se réalise notamment entre les motifs bactériens comme le peptidoglycane ou le LPS (lipopolysaccharide) et les récepteurs membranaires des cellules. Le microbiote apporte des effets positifs à son hôte en réalisant certaines fonctions : physiologiques, métaboliques et immunitaires (Figure 18). Il a été possible de mettre en évidence le rôle et les fonctions du microbiote par l'utilisation de souris axéniques (dépourvues de microbiote) (Claus et al., 2011).





**Figure 18 : Fonctions des bactéries du microbiote.** Les bactéries commensales exercent des fonctions de protection, des fonctions métaboliques et des fonctions de maturation structurelles (Grenham et al., 2011).

### A. Fonction de maturation physiologique

Le système immunitaire et le microbiote interagissent dès la naissance : le développement du système immunitaire nécessite la présence du microbiote et le système immunitaire influence la composition du microbiote (Nicholson et al., 2012). Lorsque l'on compare des souris axéniques à des souris conventionnelles, plusieurs défauts sont observés, notamment au niveau de la maturation intestinale. Les villosités sont de taille réduites indiquant une régénération cellulaire plus faible. La morphologie de l'épithélium des souris axéniques est incomplète, sa motilité intestinale est diminuée. La fonction d'absorption qui y est associée est altérée par une réduction du réseau capillaire et le métabolisme biliaire fonctionne mal, avec un taux de cholestérol élevé dans le foie (Sekirov et al., 2010; Smith et al., 2007). Le système immunitaire associé aux muqueuses est sous-développé, présentant une hypoplasie des plaques de Peyer contenant peu de centres germinatifs et un nombre réduit de plasmocytes sécréteurs d'IgA (Macpherson et al., 2001) et de cellules T (Bouladoux et al., 2013). La rate et les ganglions sont également moins structurés, un défaut de maturation du système immunitaire est observé avec une diminution du pool de cellules immunitaires (telles que la population de lymphocytes T CD4+) et une diminution de la production d'IgA sécrétoire. Les plaques de Peyer des souris axéniques sont atrophiées, ce qui provoque une diminution du nombre de follicules lymphoïdes matures associés (Smith et al., 2007). Ces défauts peuvent

être reversés après colonisation par des bactéries commensales (Hooper et al., 2001) et même avec le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis* (Mazmanian et al., 2005). Même si ces travaux restent artéfactuels, ils permettent de mieux comprendre ce qui se passe chez le nouveau-né, où l'intestin est immature. Il a été montré chez les souris axéniques que la colonisation d'une bactérie dominante, le *Bifidobacterium infantis*, dans le microbiote des bébés est partiellement responsable de la maturation du péristaltisme du GIT (Sekirov et al., 2010).

## **B. Fonction immunitaire et barrière**

Comme décrit dans le chapitre précédent, la muqueuse intestinale contient le GALT dans l'intestin grêle, des agrégats lymphoïdes dans le côlon et des cellules immunitaires dans la *lamina propria*. Au niveau de l'intestin, le système immunitaire doit donc être capable :

- de tolérer les bactéries du microbiote pour éviter une réponse immune systémique et locale en distinguant les antigènes des bactéries commensales de ceux des pathogènes (Bouladoux et al., 2013)
- d'induire une réponse immune protectrice vis-à-vis des bactéries pathogènes pour empêcher leur prolifération excessive et leur translocation vers les sites systémiques

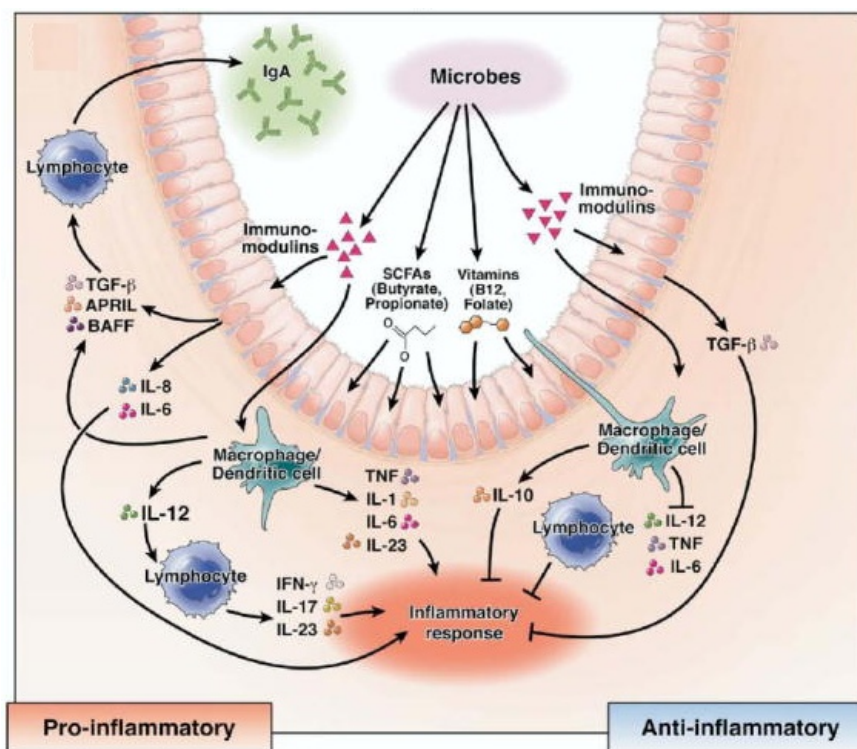
Le microbiote intestinal fournit une barrière physique contre les pathogènes par occupation des sites (muqueuse et récepteurs immuns) et consommation des éléments nutritifs (Figure 19). De plus, il produit des molécules anti-microbiennes, notamment des bactériocines et des acides organiques, et permet l'induction de peptides anti-microbiens en stimulant les cellules de Paneth qui les produisent (Gallo and Hooper, 2012). Le microbiote est également capable de stimuler la production de mucines par les cellules en gobelet et des IgA sécrétoires qui jouent un rôle clé contre les infections intestinales en interagissant avec les pathogènes (Lindén et al., 2008). La colonisation de souris axéniques par des bactéries seules ou en mélanges (Smith et al., 2007) montre une modification de la production et de la nature du mucus et induit la production de peptides anti-microbiens spécifiques (Gallo and Hooper, 2012).

Les bactéries qui composent le microbiote surtout celles du côlon sont capables de produire des vitamines essentielles utilisées et non synthétisées par l'hôte, ou encore des acides gras à chaîne courte (*cf* partie C ci-après) capable de bloquer partiellement la voie NF- $\kappa$ B et de réguler ainsi les réponses immunes maintenant une homéostasie entre l'épithélium et

les bactéries commensales (*Pour revue* Goto and Kiyono, 2012). En effet, une forte inflammation peut non seulement altérer la barrière épithéliale, mais également favoriser les bactéries pathogènes au détriment des bactéries commensales, réduisant ainsi de cette manière la diversité et installant une dysbiose favorable au développement de maladies chroniques (*Pour revue* Stecher, 2015).

La réponse immunitaire et les bactéries du microbiote sont fortement liées. Pour rappel, les cellules immunes innées de l'épithélium intestinal rapidement recrutées, telles que les phagocytes, les ILCs et les cellules dendritiques, sont importantes dans l'activation plus lente des lymphocytes T et B (*cf* chapitre 1 partie II). Leur interaction constante avec le microbiote est importante pour l'éducation du système immunitaire. Le microbiote a également un rôle dans la maturation des lymphocytes T Th17 et Treg. La colonisation d'animaux axéniques (les Th17 y sont quasi inexistantes) par la bactérie commensale filamenteuse segmentée est nécessaire pour l'induction et la différenciation de ces populations cellulaires (Honda and Littman, 2016; Mazmanian, 2009).

La bactérie filamenteuse SFB (*Segmented Filamentous Bacteria*) est une des premières bactéries colonisatrices commensales de l'iléon. Elle est importante pour la mise en place post-natale de la réponse immunitaire intestinale. Chez les souris axéniques, la colonisation unique de SFB induit une maturation du système immunitaire comparable à la colonisation par une flore classique complète, avec une forte induction d'IgA (Talham et al., 1999), une maturation des cellules T et B (Gaboriau-Routhiau et al., 2009) et une induction de la réponse Th17 (Ivanov et al., 2009).



**Figure 19 : Modulation de la réponse immunitaire par le microbiote.** Les bactéries du microbiote modulent les fonctions immunitaires de la muqueuse en sécrétant des facteurs tel que les vitamines ou les acides gras à chaîne courte (SCFAs : *short chain fatty acid*) (D'après Preidis and Versalovic, 2009).

### C. Fonction digestive et métabolique

Le microbiote est impliqué dans l'assimilation de certains nutriments, qui peuvent être ensuite utilisés par l'hôte, tels que des vitamines essentielles (B8, B9, B12 et K1) non synthétisées par notre organisme (Nicholson et al., 2012), des acides aminés essentiels ou des acides gras à chaîne courte (AGCC). Les bactéries anaérobies de l'écosystème colique produisent, à partir des glucides et des acides aminés provenant de substrats exogènes (protéines alimentaires, polysaccharides non amylacés, amidons résistants) et endogènes (mucus, cellules épithéliales desquamées, protéines endogènes), des métabolites intermédiaires (lactate, succinate) et terminaux : gaz (hydrogène, gaz carbonique et méthane), ammoniac et AGCC (Duncan et al., 2003). Les fibres alimentaires (cellulose, hémicelluloses et pectines) non hydrolysables par les enzymes de l'intestin grêle semblent représenter le principal substrat des bactéries coliques. Les AGCC sont rapidement absorbés par la muqueuse colique (Pryde et al., 2002). Les proportions d'AGCC produits varient selon la nature de la flore bactérienne colique, le temps de transit intestinal et les substrats disponibles.

L'acétate reste l'AGCC majoritaire dans le colon. Des genres bactériens particuliers conduisent à la production préférentielle de certains de ces AGCC, avec par exemple le butyrate (*Eubacterium*, *Faecalibacterium*), le propionate (*Bacteroides*, *Propionibacterium*) et l'acétate (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*).

Les AGCC exercent un effet trophique sur l'épithélium intestinal, le butyrate étant notamment décrit comme source d'énergie principale des colonocytes. Il a également un rôle dans le renforcement de la barrière en augmentant l'expression de la claudine-1 (protéine impliquée dans les jonctions serrées) (Wang et al., 2012). Il est également capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses colorectales et d'agir comme agent différenciant. L'acétate est l'AGCC majoritaire dans le côlon, il est utilisé pour la synthèse des acides gras à longue chaîne, la glutamine et le B-hydroxybutyrate. De plus, son absorption augmente la synthèse du cholestérol. Le propionate est un substrat de la néoglucogenèse hépatique et est capable d'inhiber la synthèse hépatique du cholestérol (Wong et al., 2006).

Les AGCC semblent moduler la sécrétion de mucus dans le côlon et le maintien d'un pH constant. Ils réduisent également la prolifération et/ou l'adhésion à la muqueuse colique de certaines bactéries entéropathogènes, et à l'inverse favorisent la croissance des bactéries commensales, en particulier des bactéries acido-résistantes qui elles-mêmes sont responsables de leur production, participant ainsi à l'équilibre du microbiote colique (May et al., 1994). Ils sont également capables de moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives (Smith et al., 2013), notamment la production de cytokines et chimiokines. En se fixant à certains récepteurs à la surface des cellules entéro-endocrines (dont les récepteurs couplés aux protéines G, GPR), ils sont capables de moduler la production de peptides intestinaux, particulièrement celle de peptides entéro-endocrines impliqués dans le contrôle de la satiété (PYY, GLP-1 et-2, CCK). (Hand et al., 2012; Yadav et al., 2013).

Le microbiote joue également un rôle dans le métabolisme lipidique en transformant les acides gras non absorbés par l'intestin grêle en cholestérol. Il participe aussi à la régulation du métabolisme des acides biliaires (AB). Issus du métabolisme du cholestérol, les AB composent ainsi la bile. Deux formes sont retrouvées, les AB primaires produits par les hépatocytes et les AB secondaires issus des AB primaires recyclés et réabsorbés dans le colon après déconjugaison par les bactéries du microbiote au niveau de l'intestin grêle. La CCK est l'hormone responsable du relargage du contenu de la vésicule (Grider, 1994). Le pool d'AB

est recyclé à environ 95% par la circulation entéro-hépatique. Les 5% restants sont soit métabolisés par les bactéries du côlon pour les rendre plus hydrophyles et être réabsorbés de manière passive, soit éliminés dans les fèces (Ridlon et al., 2014). Les AB vont activer 4 récepteurs, dont 3 récepteurs nucléaires : FXR (*farnesoid X receptor*) PXR (*pregnane X receptor*) VDR (*vitamin D receptor*) et un récepteur couplé aux protéines G, le TGR5. La fixation des AB sur ces récepteurs entraîne des actions sur le métabolisme lipidique, le métabolisme glucidique, l'homéostasie métabolique et l'inflammation (*Pour revue* de Aguiar Vallim et al., 2013). Le microbiote régule la synthèse des AB par la production de l'antagoniste naturel de FXR : l'acide tauro- $\beta$ -muricholique (Sayin et al., 2013). Chez les souris axéniques l'inhibition de FXR dans l'iléon augmente la sécrétion d'AB et protège contre l'obésité induite par un régime (Parséus et al., 2017). Les AB secondaires, les acides lithocholique et deoxycholique, sont les agonistes de TGR5 (*Pour revue* (Greiner and Bäckhed, 2011). L'activation *in vitro* de TGR5, dans la lignée de cellules entéro-endocrines STC-1, stimule la sécrétion de GLP-1 (Katsuma et al., 2005) ; à l'inverse l'activation de FXR diminue l'expression du GLP-1 (Trabelsi et al., 2015). L'activation de TGR5 par ses agonistes tel que l'acide oléanolique aurait un effet anti-diabétique (Sato et al., 2007), montrant ainsi l'implication des récepteurs aux AB dans la régulation du métabolisme.

#### **IV. Mise en évidence de dysbioses dans diverses pathologies**

En 400 avant J-C, Hippocrate a écrit « la mort est assise dans les entrailles » et « mauvaise digestion est la racine de tout le mal », insistant déjà ainsi sur le fait que l'intestin avait un rôle central dans le bien-être de l'homme. De nombreuses études placent actuellement les dysbioses du microbiote au centre de l'induction, du développement et du maintien de plusieurs pathologies chroniques.

Les médicaments tels que les antibiotiques et les anti-inflammatoires ont un effet délétère sur la flore et la muqueuse, tout comme le stress, les pollutions externes, les aliments déstructurés, les excès alimentaires ou le sport à haut niveau. La perturbation du microbiote entraîne des dérégulations des systèmes immunitaire et métabolique, favorisant l'apparition d'infections diverses, de fatigues chroniques et d'allergies. Si la muqueuse est agressée et inflammée de façon chronique, elle devient alors perméable aux agents pathogènes, aux métaux lourds, aux allergènes, aux levures ou aux aliments non digérés. Comme décrit précédemment, l'implantation du microbiote est une étape cruciale qui dépend de nombreux

facteurs et qui conditionne la composition à l'âge adulte. Si celle-ci est perturbée, cela peut avoir des conséquences à long terme (Matamoros et al., 2013).

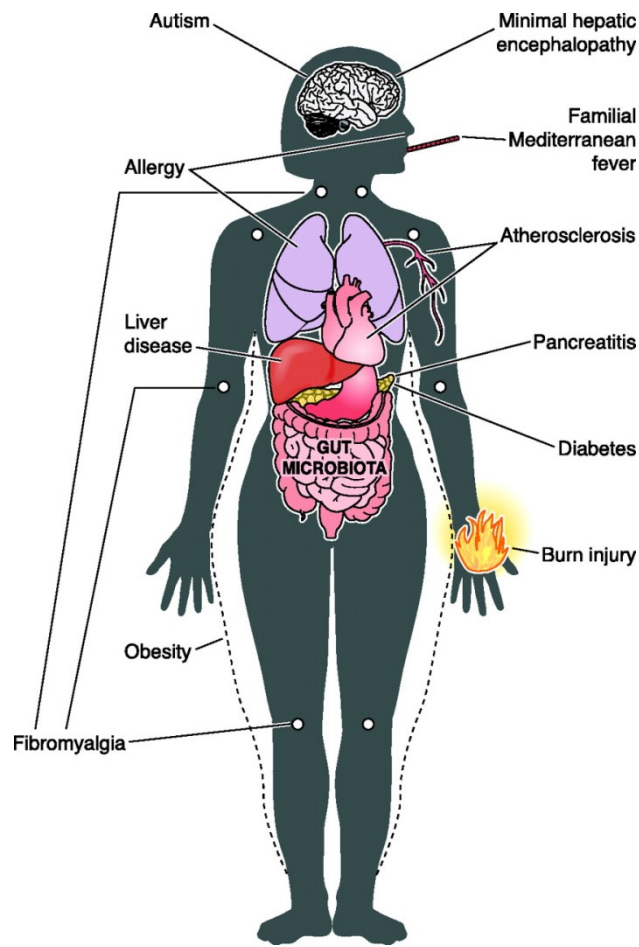
Les dysbioses du microbiote sont impliquées dans de nombreuses maladies chroniques, telles que l'allergie, les maladies intestinales chroniques inflammatoires (MICI) ou encore l'obésité. Ces deux aspects particuliers seront développés dans le chapitre suivant (*cf* chapitre 2, partie V.A.).

Des études récentes ont suggéré qu'en plus de ses fonctions métaboliques et immunitaires, le microbiote intestinal serait un point central dans la communication entre l'intestin et le cerveau et influencerait le fonctionnement cérébral. (Sekirov et al., 2010). 200 millions de neurones sont présents au niveau de l'intestin et ce système nerveux entérique communique de manière étroite avec le système nerveux central. C'est une signalisation bidirectionnelle régulée au niveau neuronal, hormonal et immunologique, vitale pour l'homéostasie intestinale. L'axe intestin-cerveau décrit un concept de physiologie intégrative : le cerveau peut influencer la motricité et la fonction sécrétoire du tractus intestinal et, inversement, les messages viscéraux peuvent influencer le cerveau. Le développement du système nerveux central et périphérique chez les souris axéniques est affecté, avec une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, impliqué dans les réponses au stress. Un phénotype comportemental et un profil neurochimique peuvent être associés au microbiote : lorsque des souris sont infectées par *Citrobacter rodentium*, leur taux d'anxiété est augmenté et cela induit des troubles de mémoire. Le cerveau peut également altérer le microbiote en induisant une perméabilité intestinale, activant la réponse immunitaire de l'épithélium. Ce dernier joue alors sur le microbiote et le module (Grenham et al., 2011), pouvant déclencher le syndrome du côlon irritable (IBS). Le microbiote est capable d'induire des molécules neuroactives comme le tryptophane, la sérotonine, la mélatonine, des catécholamines ou encore l'acétylcholine (Wang and Kasper, 2014). Ces molécules sont impliquées dans le cycle circadien, la régulation de l'humeur, la mobilité digestive et, si elles sont dérégulées, dans le stress, l'anxiété, la dépression ou encore l'autisme. Chez les enfants autistes, des études ont démontré qu'il existait une dysbiose caractérisée par une réduction des *Bacteroidetes* et une augmentation du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* (Benach et al., 2012) associées à une diminution d'*Akkermansia muciniphila* et des bifidobactéries. (Williams et al., 2012).

Le déséquilibre du microbiote pourrait également être impliqué dans les cancers colorectaux, par l'intermédiaire d'une réponse pro-inflammatoire disproportionnée au niveau de la muqueuse, augmentant alors le renouvellement de l'épithélium et la formation de lésions, puis la réparation. Ce processus répété peut aboutir à la formation de néoplasmes. Les zones du côlon touchées par ces tumeurs présentent une augmentation des *Bacteroidetes* et une diminution des *Firmicutes*, créant ainsi une niche pour les *Actinobacteria* (Marchesi et al., 2011). A l'inverse, des études récentes ont mis en évidence que certaines bactéries du microbiote peuvent améliorer les réponses anti-tumorales de certaines drogues anti-cancéreuses, notamment la cyclophosphamide (Daillère et al., 2016).

Des études ont montré qu'un déséquilibre du microbiote peut être impliqué dans diverses autres pathologies (Figure 20), comme par exemple dans la formation des calculs biliaires, de par son rôle dans le métabolisme des acides gras ou dans des maladies auto-immunes comme le diabète de type 1, la sclérose en plaque ou la polyarthrite rhumatoïde (Campbell, 2014).





**Figure 20 : Pathologies développées suite à une dysbiose du microbiote.** Ces pathologies sont multifactorielles, mais le microbiote joue un rôle important dans leur développement (Sekirov et al., 2010).

## V. Microbiote et pathologies chroniques

### A. L'obésité

#### 1. Introduction générale

L'obésité selon l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) se définit « comme un excès de masse grasse qui entraîne des conséquences néfastes pour la santé ». Cette pathologie résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques et est reconnue comme une maladie chronique (Ng et al., 2014) responsable de nombreuses complications (Mokdad et al., 1999). D'après l'O.M.S la prévalence de l'obésité a doublé entre 1980 et 2014. Avant 1980, le taux de personnes obèses était inférieur à 10%. Avant le 17<sup>ème</sup> siècle, le gain de poids était considéré comme un signe de richesse et de bonne santé. Après le 17<sup>ème</sup> siècle, les

conditions de vie s'améliorent et les revenus et l'accès à l'éducation augmentent, ainsi que la taille et le poids moyen des populations. Il a été nécessaire de définir des critères de dépistage de l'obésité.

En 1832, Adolphe Quetelet, statisticien belge, a mis au point une formule statistique pour établir une relation entre le poids et la taille d'une population adulte. En 1997, l'OMS a décidé d'utiliser cette formule comme système de mesure international de l'obésité, définissant des intervalles standards (Tableau 1) pour évaluer les risques de surpoids et d'obésité chez l'adulte : c'est l'Indice de Masse Corporelle (IMC), également appelé indice de Quetelet. C'est un moyen indirect d'estimer le surplus de masse grasse d'un individu.

Il prend en compte la taille et la masse de chaque individu et se traduit par la formule suivante : **IMC=Poids (kg) / Taille<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>).**

<b>Catégorie</b>	<b>IMC</b>
Corpulence normale	18,5 à 24,9
Surpoids	25 à 29,9
Obésité	30 à 34,9
Obésité sévère	35 à 39,9
Obésité cliniquement sévère	≥ de 40

**Tableau 2 : Valeurs de référence de l'IMC (OMS)**

L'IMC est l'outil de mesure le plus pratique pour estimer la prévalence de l'obésité dans une population donnée ainsi que les risques associés. Cependant, l'IMC présente quelques limites. Par exemple, cet indice ne propose qu'une approximation de la masse grasse, il ne prend pas en compte la composition corporelle des individus et il ne fait ainsi pas de différences entre masse musculaire et masse grasse : l'IMC ne peut donc pas être appliqué sur de grands sportifs ou des bodybuilders (Basdevant, 2006; OMS, 1997). Il existe de ce fait l'indice de masse grasse (IMG) qui corrige l'IMC en prenant en compte l'âge et le sexe de l'individu (Deurenberg et al., 1991), mais cette technique a également ses limites. Les seules méthodes fiables pour mesurer de façon certaine la masse grasse d'un individu sont les méthodes d'absorption bi-photonique à rayon X (méthode DEXA), la scanographie ou la

tomodensitométrie. Ces méthodes mesurent précisément la masse grasse, la masse osseuse et la masse musculaire.

## **2. Epidémiologie**

L'obésité est la première épidémie non infectieuse, elle touche actuellement autant les pays industrialisés que les pays en voie de développement.

### **a. Dans le monde**

En 2014, l'obésité touchait 13% de la population adulte mondiale (11% d'homme, 15% de femmes), soit 600 millions de personnes. Elle est actuellement la première épidémie mondiale, touchant autant les pays développés que les pays en voie de développement. Aux Etats-Unis, cette épidémie est un problème majeur. La prévalence y est la plus élevée au monde et elle a doublé depuis 1980, sachant que 30 % des Américains étaient obèses en 2008 (Flegal et al., 2010). En Chine, entre 1989 et 2000, la prévalence a triplé en zones urbaine et rurale (respectivement 32 % et 15,5 %) (Wang et al., 2006).

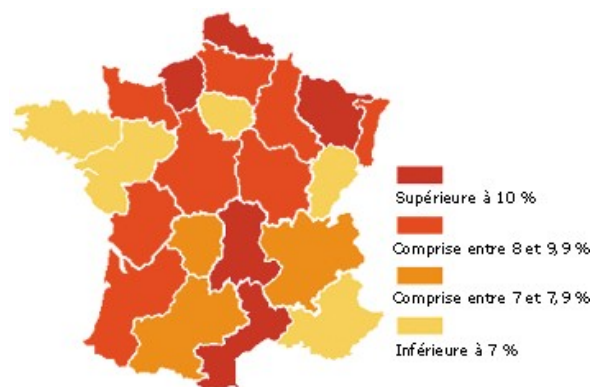
En 2014, 41 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou obèses. En Afrique, le nombre d'enfants en surpoids ou obèses a doublé entre 1990 et 2014 passant de 5,4 millions à 10,6 millions. L'OMS a étudié de 1985 à 1995 avec le projet MONICA (MONItorage multinational des tendances et déterminants en matière de maladies Cardio-vasculaires) la prévalence de l'obésité en Europe. Ce rapport nous permet d'observer une augmentation de la prévalence de l'obésité de 10 à 50 % dans les pays européens (Hyde, 2008), l'augmentation la plus marquante étant en Angleterre, où elle a doublé entre 1980 et 1995 (6 % à 15 % pour les hommes et de 8 % à 16,5 % pour les femmes) (OMS, 2003).

### **b. En France**

En France et ce depuis 1997, les enquêtes ObEpi suivent tous les 3 ans l'évolution de la prévalence de l'obésité et du surpoids chez l'adulte de plus de 18 ans, de manière globale et régionale. En 2012, sur 25 714 individus il a été rapporté que 32,3 % des Français étaient en surpoids et que 15 % présentaient une obésité, soit 6,9 millions de personnes. C'est 3,35 millions d'individus de plus qu'en 1997 (ObEpi, 2012). Mais les résultats des enquêtes sont considérées comme sous estimées, les données de mesures étant rapportées par les personnes elles-mêmes. Cependant, l'INSERM confirme l'enquête ObEpi 2012 avec l'analyse des

premiers résultats de la cohorte « Constance » (dont le protocole de mesure est standardisé, et réalisé par des professionnels de santé), avec une prévalence de 15,3% chez les hommes et 16,8% chez les femmes (Matta et al., 2016).

Dans ces deux études, on peut identifier la région où la prévalence de l'obésité est la plus élevée. Il s'agit des Hauts de France, avec une prévalence comprise entre 21,8 et 25,6 % (ObEpi-Constances). Paris est le département qui semble le moins touché par l'obésité avec une prévalence de 10,7 %, mais ObEpi met en avant que plus l'agglomération est grande, moins le risque est élevé.



**Figure 21 : Incidence de l'obésité en France par région (The Lancet, 2013).**

### 3. Aspect économique

D'après l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économique), l'espérance de vie d'une personne présentant une obésité légère est diminuée de 2 à 4 ans par rapport à une personne de poids normal, et pour une personne avec une obésité sévère de 8 à 10 ans. Nous pouvons comparer ces écarts d'espérance de vie chez les personnes souffrant d'obésité à la perte d'espérance de vie des fumeurs (Sassi, 2010).

Le développement de l'obésité déclenche de nombreuses complications au niveau de la santé. Sur le plan individuel dans le monde, une personne obèse doit faire face à des dépenses de santé entre 6 et 45 % plus élevées que celles d'une personne de poids normal. Au niveau mondial, l'obésité représenterait 0,7 à 2,8 % des dépenses totales de santé (Withrow and Alter, 2011).

En France en 2002, une étude de l'IRDES (Institut de recherche et documentation en économie de la santé) a estimé ce coût total annuel entre 1,5 et 4,6% des dépenses de santé, ce

qui représente entre 2,1 et 6,2 milliards d'euros (Emery et al., 2007). Pour une personne obèse, le coût médical moyen serait de 2 500 euros, le double d'une personne non obèse. En comparaison, l'Union Européenne estime les coûts annuels de l'obésité entre 15 et 32 milliards d'euros en 2006, ce qui représente 7% des dépenses de santé (Hyde, 2008).

Aux Etats-Unis en 2008, l'obésité représentait entre 5 et 10 % des dépenses de santé soit 122 milliards de dollars (Tsai et al., 2011).

#### **4. Les différents types d'obésité, les complications et les facteurs de risques**

Le tissu adipeux joue un rôle très important dans la prise de poids, il peut se répartir à différents endroits dans le corps. L'excès de gras ou adiposité peut résulter soit d'une augmentation de la taille des adipocytes qui composent le tissu adipeux par stockage de lipides (phénomène d'hypertrophie), soit d'une augmentation de leur nombre (phénomène d'hyperplasie). Selon sa localisation, deux types d'obésité peuvent être définis avec des complications associées différentes :

- L'obésité androïde : le tissu adipeux est plutôt localisé au niveau viscéral, abdominal. Ce phénomène est majoritairement observé chez les hommes et est associé à une augmentation des risques cardio-vasculaire et métabolique. Sa gravité s'évalue en mesurant le tour de taille.
- L'obésité gynoïde : le tissu adipeux se répartit surtout dans les fesses, les hanches et les cuisses, de manière sous-cutanée. Ce type d'obésité touche essentiellement les femmes.

L'obésité est une préoccupation majeure de santé publique, chaque année 2,8 millions d'individus décèdent suite aux maladies chroniques développées à cause de l'obésité. Ces maladies chroniques associées sont en particulier le diabète de type 2 (développé ci-après), l'hypertension et les maladies cardio-vasculaires ou respiratoires. Les personnes développant une obésité sévère ont 60 fois plus de risques de développer un diabète de type 2 que les personnes de poids normal. L'hypertension artérielle et la hausse du taux de cholestérol sont également plus fréquentes lorsque le poids augmente, de ce fait les personnes obèses sont plus susceptibles de développer une maladie cardio-vasculaire (Malnick and Knobler, 2006). Les facteurs de risques associés à la prise de poids excessive sont nombreux et pas encore

totallement identifiés. Les plus connus et décrits sont les facteurs génétiques, comportementaux et environnementaux (Basdevant, 2006).

L'interaction gène-environnement a un rôle important dans l'obésité. Un groupe de gènes a été décrit comme ayant un impact sur la prise de poids. Ainsi un enfant présente 80 % de risque de devenir obèse à l'âge adulte si l'un de ses parents est obèse, contre 10 % si aucun des deux ne l'est. Plusieurs études ont décrit ce lien génétique chez des jumeaux monozygotes. Lorsqu'ils sont soumis à une même alimentation pendant plusieurs mois, leur prise de poids est parfaitement identique (Bouchard et al., 1990). Un des gènes impliqués dans l'obésité est le gène du récepteur à la leptine, hormone anorexigène produite par le tissu adipeux (Clément et al., 1998).

Concernant les facteurs de risques comportementaux, les plus connus sont l'augmentation de la consommation d'aliments gras ou sucrés et la réduction des dépenses énergétiques. L'augmentation de ces facteurs de risques est due aux changements sociétaux des dernières décennies, notamment avec l'apparition des services de restauration rapide très grasse, ou encore la consommation de plats préparés très sucrés, l'utilisation des moyens de transport au détriment de la marche et la diminution de la pratique de sport (OMS, 2003).

Pour les facteurs environnementaux, les milieux familial, socio-économique et professionnel seraient en cause. Une inégalité socio-économique dans la prévalence de l'obésité a été mise en avant, l'obésité étant plus fréquente dans les foyers précaires. Elle est de 24,1 % lorsque les revenus du foyer sont inférieurs à 1 200 € et baisse jusqu'à 8,4% lorsqu'ils sont supérieurs à 3 800€. Cette inégalité est également observée en fonction du niveau d'instruction des foyers, inversement corrélé à la prévalence de l'obésité (Matta et al., 2016; ObEpi, 2012).

## **5. Dérégulation métabolique et facteurs impliqués**

### **a. L'obésité : un problème de balance énergétique**

L'obésité est la conséquence ultime d'un déséquilibre à long terme de la balance énergétique. Le bilan énergétique est un équilibre entre les apports caloriques essentiellement fournis par l'alimentation et les dépenses énergétiques (métabolisme de base, activité physique et thermogénèse). Tout gain de masse résulte d'une augmentation des apports

caloriques et/ou d'une réduction de la dépense énergétique totale, entraînant une dérégulation de l'homéostasie énergétique. Les facteurs métaboliques associés à ce déséquilibre sont :

- la déviation des substrats énergétiques vers la synthèse et le stockage des triglycérides
- l'augmentation de l'efficacité dans la dégradation des carbohydrates (acides gras et acides aminés) et le stockage de l'énergie qui en résulte dans le tissu adipeux sous forme de triglycéride
- la diminution de la consommation d'énergie dans le travail physiologique et le stockage de l'excès d'énergie dans le tissu adipeux.

L'équilibre énergétique est lié aux hormones et aux signaux du système nerveux. Les adipocytes régulent cette balance par des mécanismes endocriniens et non-endocriniens.

#### **i. Le tissu adipeux brun**

Le tissu adipeux brun (BAT) a un rôle dans la thermogénèse, ce qui correspond à la production de chaleur lors d'une activité musculaire, de l'activité du métabolisme ou de l'activité de lipolyse du BAT. Le tissu adipeux brun est composé d'adipocytes comme le tissu adipeux blanc, mais ces adipocytes contiennent beaucoup de mitochondries (ce qui confère sa couleur au tissu) et des gouttelettes lipidiques de petites tailles. La forte quantité de mitochondries va permettre par l'intermédiaire de l'oxydation mitochondriale des acides gras la production d'énergie (ATP) qui est ensuite convertie en chaleur. Cette production de chaleur facilite l'élimination des triglycérides. Une caractéristique principale du BAT est d'exprimer UCP-1 (*uncoupling protein-1*), une protéine membranaire qui facilite la diffusion des protons au détriment de l'ATP (Bartelt et al., 2011; Chechi et al., 2013). Une diminution de la taille du tissu adipeux brun chez la souris est liée au développement de l'obésité, du diabète de type 2 et de dyslipidémies. Le tissu adipeux brun est essentiel dans la régulation du glucose ; plus son activité est grande, moins il y a de risque de développer une résistance à l'insuline (Stanford et al., 2013).

#### **ii. Le tissu adipeux blanc**

Le tissu adipeux blanc (WAT) est le tissu de stockage des triglycérides, sous le contrôle du pancréas. Il est constitué d'adipocytes caractérisés par une grande et unique vacuole lipidique (Ramsay, 1996). Ce tissu a quelques rôles mécaniques, notamment de protection comme au

niveau des yeux, ou au niveau des parties du corps exposées à un stress mécanique, un rôle de protection thermique et un rôle dans la reproduction (Michalakis et al., 2013). Le WAT est un organe endocrine, il produit des adipokines, des cytokines et des acides gras non-estérifiés. Ces facteurs servent à établir un dialogue entre le tissu et le reste de l'organisme, permettant le stockage des lipides et de la masse grasse, l'homéostasie glucidique, la réponse immunitaire et la balance énergétique.

#### *Différenciation du tissu adipeux*

La différenciation du WAT est régulée par PPAR $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), qui induit le changement morphologique, l'accumulation de lipides et l'expression de tous les gènes caractéristiques des adipocytes. Les deux autres gènes importants dans la différenciation sont C/EBP $\beta$  qui active PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  qui maintient l'expression de PPAR $\gamma$  (*CCAAT/enhancer-binding protein*) (Rosen et al., 2002, pour revue Avram et al., 2007; Farmer, 2006).

#### *Homéostasie glucidique*

Au cours de l'obésité, le tissu adipeux étant plus développé, les hormones qu'il produit sont dérégulées. Cette adiposité entraîne une plus forte concentration de leptine, rendant ainsi les tissus cibles résistants (Considine et al., 2009).

L'adiponectine est une adipokine qui prévient le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance. Son taux est moins élevé chez les sujets obèses (Hu et al., 1996). L'adiponectine est également capable de diminuer *in vitro* la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 des macrophages (Ouchi et al., 2000), sa propre expression étant régulée par ces molécules (Bruun et al., 2003).

### **b. L'obésité : une maladie inflammatoire de bas grade**

L'obésité est caractérisée par une inflammation chronique à bas bruit. Le tissu adipeux comme décrit précédemment est capable de produire des adipokines pro-inflammatoires : le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Kern et al., 2001). Elles sont sécrétées par les adipocytes : en cas de surpoids et d'obésité, la taille du tissu adipeux augmente et de ce fait leur production également, entraînant ainsi une inflammation chronique et favorisant la résistance à l'insuline (Hotamisligil et al., 1993, 1995; Klover et al., 2003; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). La production de ces cytokines pro-inflammatoires induit le recrutement des macrophages dans le tissu suite à la production de la chimiokine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*

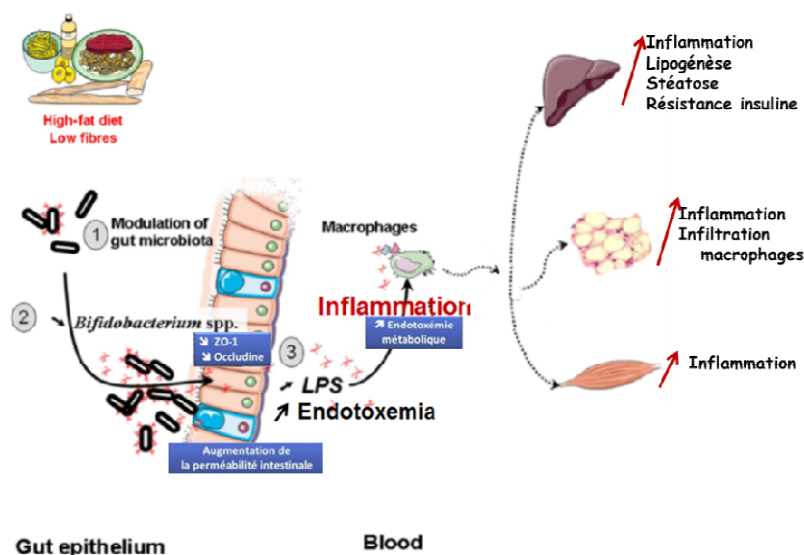


l), ce qui entretient l'état inflammatoire (Fried et al., 1998; Sartipy and Loskutoff, 2003). Le TNF- $\alpha$  est le principal inhibiteur de l'adiponectine et il active la production d'IL-6 et de la résistine (Bruun et al., 2003).

La résistine est une petite molécule inflammatoire hyperglycémiante sécrétée par le tissu adipeux. Son taux est élevé dans l'obésité et elle est impliquée dans la réduction de l'absorption du glucose par les muscles et le tissu adipeux. Elle serait l'hormone inductrice de l'insulino-résistance (Way et al., 2001).

### **c. L'obésité : un intestin plus perméable**

Les observations d'hyperperméabilité se basent sur des travaux réalisés sur des rongeurs rendus obèses par un régime hyperlipidique (*Pour revue* Bischoff et al., 2014; Moreira et al., 2012). Dans ces modèles, des modifications des jonctions serrées (ZO-1, occludine), mise en évidence par une augmentation du passage de traceurs de grande taille, jouent un rôle très important dans l'augmentation de la perméabilité (Cani et al., 2008) (Figure 22). Ces observations ont également été rapportées chez des patients obèses (Teixeira et al., 2012). Les changements de régime alimentaire et notamment l'augmentation de la proportion des graisses dans l'alimentation favorise l'expansion de bactéries à Gram négatif, diminuant ainsi la diversité bactérienne du microbiote, ce qui a pour conséquence une augmentation des taux de Lipopolysaccharide (LPS) corrélée à une diminution de la sensibilité à l'insuline (Cani et al., 2007b). La reconnaissance du LPS par le TLR4 déclenche la voie de signalisation des cytokines pro-inflammatoires (Cani et al., 2007b; Erridge et al., 2007) maintenant l'inflammation chronique à bas bruit.



**Figure 22 : Impact du microbiote dans le développement de l'obésité.** Des modifications dans la composition du microbiote induites par un régime hyperlipidique favorisent la perméabilité intestinale et la translocation de LPS augmentant de ce fait l'endotoxémie et facilitant le développement des désordres métaboliques (*D'après Cani and Delzenne, 2009*).

#### **d. L'obésité : un facteur clé dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2**

L'obésité est une des causes majeures de l'insulino-résistance (*Pour revue, Després and Lemieux, 2006*) et du développement du diabète de type 2. La résistance à l'insuline est une autre condition multifactorielle liée à l'inflammation chronique de bas grade. Des taux élevés d'IL-6 sont mesurés au cours de l'insulino-résistance (Klover et al., 2003). Les cytokines pro-inflammatoires dérèglent la signalisation de l'insuline : le TNF- $\alpha$ , en stimulant la lipolyse et le relargage des acides gras libres, diminue la sensibilité à l'insuline et perturbe ainsi l'homéostasie glucidique (Guilherme et al., 2008; Guo, 2014; Hotamisligil et al., 1993). Une diminution du taux de certaines adipokines, comme l'adiponectine, augmente la résistance à l'insuline dans l'obésité : sa restauration à l'inverse améliore la résistance à l'insuline (Yamauchi et al., 2001). La leptine est capable d'améliorer la résistance à l'insuline dans le diabète (Shimomura et al., 1999). Suite au développement de l'insulino-résistance et de l'épuisement de la production d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas, le diabète de type 2 s'installe. Les taux élevés d'IL-6 sont un facteur de développement du diabète de type 2 (Pradhan et al., 2001).

## 6. Obésité et dysbiose du microbiote

L'obésité est caractérisée par une dysbiose du microbiote, notamment par une diminution du rapport *Bacteroides/Firmicutes* (Ley et al., 2005, 2006), proportionnelle à une augmentation de la capacité du microbiote à stocker l'énergie fournie par l'alimentation (Bäckhed et al., 2004), ce qui est un facteur de risque dans l'obésité, comme décrit précédemment. Actuellement, une diminution de la diversité bactérienne est mise en avant et plus spécifiquement une diminution de certaines bactéries connues pour leurs effets bénéfiques telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, des bifides ou encore *Akkermansia muciniphila* (Everard et al., 2013; Hansen et al., 2012; Qin et al., 2012). Il existe notamment une corrélation inverse entre le nombre de bifidobactéries et l'endotoxémie, suggérant qu'un déséquilibre du microbiote et une translocation de composants bactériens perturbent l'intégrité de la barrière et participent ainsi au déséquilibre de l'homéostasie métabolique (Cani et al., 2007c).

Des études de transfert de flore ont montré que le microbiote avait un rôle important dans le développement de l'obésité. En effet si la flore d'une souris obèse est transférée à une souris mince, cette dernière va acquérir le phénotype obèse (Kulecka et al., 2016). De la même manière une étude a été réalisée avec des jumeaux, dont l'un était obèse. La souris ayant reçu le microbiote du jumeau obèse a pris plus de poids que la souris ayant reçu le microbiote du jumeau de poids standard (Ridaura et al., 2013). Lors de l'étude de la composition des fèces, il est apparu que les fèces des sujets obèses contiennent moins de calories que les fèces des sujets minces, permettant alors de suggérer que le microbiote des sujets obèses est capable d'extraire plus d'énergie que celui des sujets minces (Turnbaugh et al., 2006).

La fermentation des fibres effectuée par les bactéries du microbiote, comme décrit précédemment, induit la production d'AGCC ayant le rôle de substrats énergétiques, de médiateurs, de modulateurs des fonctions métaboliques et de régulateurs de la diversité bactérienne du microbiote. Au cours de l'obésité, une perte de la diversité bactérienne est observée avec une diminution de la production d'AGCC (Fernandes et al., 2014), ce qui se traduit par une augmentation de la perméabilité de la barrière et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les AGCC ayant aussi une action sur le métabolisme des lipides (notamment le butyrate), une diminution de leur concentration peut conduire au développement du syndrome métabolique, de l'obésité et du diabète de type 2.

Une étude métagénomique a établi une association entre différents types de microbiote et le risque de développer de l'insulino-résistance et un diabète de type 2, notamment avec une diminution des bactéries butyrogènes (Qin et al., 2012). Le butyrate et les AGCC étant essentiels pour la maturation de l'épithélium, un dérèglement de leur production peut entraîner une diminution de la fonction barrière et donc une inflammation liée à l'endotoxémie, conduisant à insulino-résistance.

## **B. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

### **1. Introduction générale**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent entre autre deux grandes pathologies, la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ce sont des maladies touchant généralement des sujets jeunes et évoluant de manière chronique, avec une alternance entre poussées et périodes de rémissions. Ces pathologies présentent une morbidité élevée et sont hétérogènes sur le plan clinique. La MC est caractérisée par une inflammation transmurale pouvant s'étendre à l'intégralité du tube digestif et est associée à une réponse de type Th1 (IL-12, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) et Th17 (IL-17A, IL-21, IL-23). La RCH est plus diffuse et restreinte à la muqueuse et sous-muqueuse du côlon et du rectum et est associée à la production de cytokines Th2 (IL-5 et IL-13) (*Pour revue Shih and Targan, 2008; Strober et al., 2007*).

A l'heure actuelle cinq classes de médicaments sont utilisés en tant que traitements : les corticoïdes, les immunosuppresseurs, les salicylés de type mésalazine, les antibiotiques et les biothérapies de type anti-TNF. Ces traitements sont combinés pour que la balance bénéfices/effets secondaires soit la plus possible à l'équilibre bien que des risques persistent néanmoins. Les traitements peuvent toutefois être combinés à des thérapies non médicamenteuses.

### **2. Epidémiologie et étiologie**

Une augmentation de l'incidence des MICI a été remarquée ces dernières années. En ce qui concerne la prévalence des MICI, un gradient Nord/Sud peut être observé, que ce soit en Europe (Shivananda et al., 1996) ou en Amérique (Ogunbi et al., 1998). En France, la

prévalence des MICI est répertoriée dans le registre EPIMAD (2015) qui met en évidence une prévalence de la MC ( $6,7/10^5$ ) plus élevée que celle de la RCH ( $3,5/10^5$ ).

Les facteurs impliqués dans le développement des MICI sont encore mal connus, mais ils font intervenir des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux.

Les facteurs génétiques sont fortement impliqués dans le développement des MICI. Des mutations dans le gène CARD15/NOD2 (*caspase recruitment domain-containing protein 15/nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2*) ont été décrites comme ayant un rôle dans le développement de la MC (Hugot et al., 2001). Ce récepteur de l'immunité innée intervient dans la détection de composants de la paroi bactérienne et à un rôle important dans le maintien de la barrière. Des études métagénomiques ont identifié de nombreux autres gènes de susceptibilité (Ellinghaus et al., 2012; Franke et al., 2010), dont les gènes de l'autophagie ATG16L1 (*Autophagy 16 Like 1*) et IRGM (*Immunity Related GTPase M*) ou encore les clusters de gènes des interleukines 1, 2, 10 et 23 (Duerr et al., 2006). L'influence génétique est plus forte dans la MC que dans la RCH, comme cela a été démontré chez des jumeaux monozygotes (Halfvarson et al., 2003).

Parmi les facteurs environnementaux, le tabac a une forte incidence. Dans le contexte de la RCH il a un effet protecteur, alors qu'il aggrave la MC (Cosnes et al., 1996). L'augmentation des taux de graisse et de sucre dans l'alimentation et l'augmentation du stress auraient également une action dans le développement des MICI en dérégulant la flore. Le niveau d'hygiène très élevé durant l'enfance -qui induit une mauvaise éducation du système immunitaire- provoquerait là encore la dérégulation de la balance immunitaire qui accompagne les MICI (Ekbom and Montgomery, 2004).

### **3. MICI et balance immunitaire**

Le système immunitaire intestinal, comme décrit précédemment, a pour rôle d'entretenir la tolérance et le dialogue entre le microbiote et l'hôte afin de maintenir l'homéostasie. Il est reconnu que les MICI sont associées à une réponse immune inappropriée à l'encontre du microbiote chez des individus génétiquement prédisposés. Cette perte de tolérance conduit aux lésions intestinales (Sartor, 2008).

La signalisation des TLR est impliquée dans le développement des MICI, notamment les polymorphismes de TLR3 et 4 (Jager et al., 2007). Les TLR 2, 3 et 4 sont fréquemment surexprimés dans les macrophages intestinaux dans la MC et la RCH (Szebeni et al., 2008). Une augmentation de l'expression des TLR dans la muqueuse des patients peut conduire à une augmentation de la sensibilité. Des macrophages CD68<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> sont également retrouvés dans les muqueuses des patients atteints des deux types de MICI (Frolova et al., 2008).

Comme décrit précédemment, les MICI sont fortement corrélées aux polymorphismes de NOD2, il en existe trois majeurs (Hugot et al., 2001). Ces mutations entraînent l'inactivation de la voie NF-κB et un défaut de fonction des cellules de Paneth, mais également un dérèglement des processus d'autophagie, perturbant de cette manière le bon fonctionnement de la défense anti-bactérienne (Inohara et al., 2003).

#### **4. Perte de contrôle du microbiote, défaut dans les cellules de Paneth**

Les patients atteints de MICI présentent une augmentation de la perméabilité intestinale. La fonction barrière est altérée, avec notamment une réduction de l'épaisseur du mucus. La couche étant plus fine et irrégulière, l'épithélium se trouve ainsi en contact direct avec le microbiote (Swidsinski et al., 2007). Chez les patients atteints de MC et de RCH, un défaut de production des peptides antimicrobiens est retrouvé, accompagné d'une diminution de la sécrétion des α-défensines dans la muqueuse de l'iléon des patients. Cette perte de production est liée à un polymorphisme de NOD2 dans les cellules de Paneth (Wehkamp et al., 2004). Un polymorphisme dans le gène de l'autophagie ATG16L1 a également une action dans l'inhibition de l'activité des cellules de Paneth et l'augmentation de l'inflammation. Les cellules de Paneth possèdent un rôle important dans le développement des MICI (Adolph et al., 2013).

#### **5. Autophagie et MICI**

L'autophagie, du grec *αυτο* (soi-même) et *φαγειν* (manger), est le processus de régulation cellulaire dégradant et recyclant les protéines et les organites non-fonctionnels présents dans le cytoplasme. L'autophagie joue un rôle important dans la croissance cellulaire, la différenciation, l'homéostasie cellulaire et les mécanismes de défense *via* l'élimination des pathogènes intracellulaires ou xénophagie (virus, parasites, bactéries) et la génération de

peptides présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Des travaux récents ont permis d'établir des relations entre autophagie et immunité innée (*Pour revue* Amano et al., 2006; Deretic, 2012; Ling et al., 2006).

La voie de l'autophagie est composée d'une trentaine de gènes nommés *ATG* (*autophagy related genes*). L'autophagie peut être induite par différents signaux en amont, dont l'activation de récepteurs de l'immunité innée comme les TLR, NOD1 et NOD2. NOD2 participe au recrutement de l'ATG16L1. Dans les cellules dendritiques de patients atteints de MC un défaut de ATG16L1 peut être mis en évidence caractérisé par des altérations du processus xénophagique et des fonctions de présentation antigénique (Cooney et al., 2010). Une dérégulation de NOD2/ATG16L1 peut ainsi agir dans le développement des maladies.

Une homozygotie d'ATG16L1 joue un rôle dans le dysfonctionnement des cellules de Paneth, mais les mécanismes restent obscurs (Cadwell et al., 2008).

Les polymorphismes de ATG16L1 et IRGM retrouvés dans les MICI sont associés à une altération de la dégradation et de l'élimination des pathogènes intracellulaires (Biswas et al., 2008)

## **6. Les bactéries pathogènes associées**

Les défauts d'autophagie et de réponses anti-bactériennes, ainsi que la diminution de l'épaisseur du mucus peuvent entraîner la prolifération de bactéries pathogènes. Chez les patients atteints de MICI, les *Escherichia coli* adhérents-invasifs (AIEC) sont fréquemment retrouvées associées aux muqueuses (Lapaquette et al., 2010). D'autres bactéries potentiellement pathogènes sont également observées, telles que des *Helicobacter*, des *Yersinia* et des *Mycobacter* (Mukhopadhyaya et al., 2012).

## **7. Rôle du microbiote dans les MICI**

Chez les souris axéniques, il reste difficile d'induire une colite, montrant ainsi le rôle du microbiote. Des études ont démontré qu'une colite expérimentale pouvait être induite chez une souris saine par transfert de flore (*Pour revue* Peloquin and Nguyen, 2013; Wang et al., 2014). Le traitement de patients par des antibiotiques à l'inverse améliore les pathologies.

Le microbiote contient plusieurs types de micro-organismes qui interagissent ensemble et avec l'hôte dans un équilibre immunologique. Ces symbiotes sont un équilibre subtil entre un faible nombre de pathogènes et un très grand nombre de bactéries commensales. Lors d'une dysbiose, la flore rompt son équilibre, le nombre de pathogènes augmente, déclenchant des cascades inflammatoires (*Pour revue* Round and Mazmanian, 2009). Des études ont mis en évidence dans la MC que cette dysbiose du microbiote est liée à un facteur de rechute. Plusieurs études décrivent la diminution quantitative et qualitative des *Firmicutes* chez les patients atteints de MICI, en particulier la diminution de l'abondance de certains *Clostridium*, de *Faecalibacterium prausnitzii* et de l'espèce *Akkermansia muciniphila* faisant partie des *Verrucomicrobiaceae*. Ces dernières ont un rôle anti-inflammatoire important. A l'inverse, une augmentation des espèces pro-inflammatoires comme certains *Bacteroidetes*, des *Fusobacterium* et des *Enterobacteriaceae* est retrouvée chez les patients (Allen-Vercoe and Jobin, 2014; Martín et al., 2015; Prosberg et al., 2016; Sokol et al., 2008; Walters et al., 2014).



## **Chapitre 3 : Ciblage du microbiote comme nouvelle alternative thérapeutique**

### **I. Les différentes méthodes de modulation du microbiote**

#### **A. La transplantation fécale**

Les premières descriptions de transfert de flore sont reportées dans un manuel chinois du IV<sup>ème</sup> siècle par le médecin Ge Hong, qui prescrivait une suspension fécale humaine par voie orale (la *yellow soup*) chez les patients atteints d'intoxication alimentaire, de diarrhée sévère ou de maladies abdominales. La transplantation fécale consiste à prendre le microbiote total d'une personne saine (donneur) et de l'implanter chez un patient dont le microbiote est perturbé (receveur) dans le but de rétablir l'homéostasie. L'utilisation la plus connue du transfert de flore est le cas d'infections récurrentes par *Clostridium difficile* dans lequel les traitements antibiotiques n'ont pas d'effet (Bakken et al., 2011). L'efficacité du transfert de flore dans les MICI est plus controversée, une étude randomisée sur 122 patients indique que seulement 36 % seraient en rémission. Les patients MC présenteraient néanmoins une meilleure réponse à un transfert de flore (61 % de rémission pour MC contre 22 % pour les patients RCH) (Colman and Rubin, 2014).

Une seule étude de transfert de flore chez l'homme, de sujets minces vers des patients obèses présentant un syndrome métabolique, a conduit à des effets positifs, le transfert de microbiote ayant amélioré la sensibilité des receveurs à l'insuline. Cet effet a été corrélé à une restauration du niveau de bactéries productrices de butyrate (Vrieze et al., 2012). Dans les modèles murins d'obésité induite, une transplantation fécale de souris minces sur des souris obèses tend à restaurer la diversité du microbiote des souris obèses. Cependant, cet effet est associé à une accélération de l'obésité, avec un gain de poids supérieur (Kulecka et al., 2016). Ceci indique clairement qu'il reste difficile de définir un microbiote intestinal « sain » en raison des multiples facteurs en jeu lors de l'interaction hôte-microbiote. Des études plus approfondies sont donc nécessaires pour améliorer l'utilisation du transfert de microbiote.

## B. Les prébiotiques

Les prébiotiques sont actuellement définis comme « tout ingrédient fermenté sélectivement qui induit des changements spécifiques dans la composition et/ou l'activité du microbiote intestinal, conférant ainsi des bénéfices pour la santé de l'hôte » (Gibson and Roberfroid, 1995; Roberfroid et al., 2010). Ce concept a été récemment rediscuté, la condition de spécificité ayant été remise en cause (*Pour revue* Bindels et al., 2015). Ce sont généralement des fibres non digestibles, solubles ou insolubles, naturelles ou synthétiques. Pour être caractérisées comme prébiotiques, ces fibres doivent être résistantes à l'acidité gastrique, être fermentables par le microbiote et avoir des effets positifs sur l'hôte (*Pour revue* Gibson et al., 2004). Il existe plusieurs sortes de prébiotiques bien définies : l'Inuline, les fructo-oligosaccharides et les galacto-oligosaccharides. Leur fermentation conduit à la production d'AGCC pouvant être utilisés comme source d'énergie et influencer positivement le métabolisme de l'hôte *via* notamment une régulation de l'homéostasie glucidique et de la prise alimentaire (*Pour revue* Flint et al., 2012).

Chez l'homme, les prébiotiques sont capables de moduler le microbiote en augmentent la proportion de bifidobacteries dans les fèces (Silk et al., 2009). L'effet des fibres sur la santé a été démontré : elles ont notamment un effet protecteur dans des modèles murins de colites induites par le TNBS (*2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid*) et le DSS (*Dextran Sulfate Sodium*) (Daddaoua et al., 2006; Lara-Villoslada et al., 2006; Videla et al., 2001). Leur effet a été également mis en avant dans l'obésité. Les régimes enrichis en fibres sont connus pour améliorer la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, aussi bien chez les individus minces que chez les obèses diabétiques (Robertson et al., 2003). Dans des modèles murins d'obésité induite, ces régimes sont capables d'améliorer les fonctions barrière et immunitaire ainsi que la sensibilité à l'insuline (Everard et al., 2014). Leur effet bénéfique dans l'obésité est associé à une modulation du microbiote, notamment à une augmentation *d'Akkermansia muciniphila* (Everard et al., 2013).

## C. Les probiotiques

En 1905, Elie Metchnikoff, scientifique russe, fait le lien entre la bonne santé et la longévité des paysans bulgares et leur consommation de lait fermenté, ancêtre du yaourt contenant une bactérie produisant de l'acide lactique découverte par Stamen Grigorov : le « Bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). En 1907, il affirme que, *via* l'alimentation, les « microbes nuisibles peuvent être remplacés par des microbes bénéfiques » (Pour revue Fisberg and Machado, 2015; Ozen and Dinleyici, 2015). Dans le même temps, un pédiatre français, Henry Tissier, a observé chez des enfants souffrant de diarrhée une diminution de l'abondance de bactéries « bifides » en forme de Y : les *Bacillus bifidus communis*, comparativement à des enfants sains. Il a ensuite suggéré que l'administration de ces bactéries à des patients diarrhéiques pourrait les aider à restaurer une flore saine. En 1917, Alfred Nissle a isolé à partir des fèces d'un soldat de la Première Guerre Mondiale n'ayant jamais contracté d'infection intestinale une souche non pathogène d'*Escherichia coli*, appelée de ce fait souche Nissle 1917. Il l'a utilisée pour traiter des patients souffrant de troubles intestinaux. Cette souche *E. coli* Nissle 1917 est actuellement commercialisée sous le nom de Mutaflor.

A ce jour, la gamme de produits contenant des probiotiques s'est largement étendue. En 2007, le marché économique mondial des probiotiques a été estimé à 4 milliards de dollars (The Lancet, 2008), à 23,4 milliards d'euros en 2013 et est estimé à 36 milliards pour 2018 (Nutrikéo, 2014). Les champs d'application sont nombreux : désordres intestinaux, intolérance au lactose, santé bucco-dentaire, obésité, troubles du comportement, nutrition sportive, alimentation infantile, cosmétiques... Les probiotiques sont commercialisés soit sous forme de produits fermentés (yaourts, kéfir, légumes marinés et fromages), soit sous forme de compléments alimentaires. Deux probiotiques en France ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) : l'ultra-levure composée de *Saccharomyces boulardii* et le Bacilor contenant la souche *L. rhamnosus* Lcr35. Les autres probiotiques disponibles sans AMM sont des compléments alimentaires ayant bénéficié d'études cliniques rapportant des effets positifs sur la santé, comme le Lacteol qui est le premier médicament contenant des probiotiques, comprenant un *Lactobacillus acidophilus* découvert en 1907 par Pierre Boucard (Davies, 2011), ou encore le Lactibiane Reference de la société PiLeJe (Drouault-Holowacz et al., 2008). Cependant, les nouvelles réglementations européennes (EFSA, *Autorité européenne de sécurité des aliments*) exigent des industriels qu'ils étayent leurs arguments concernant les

allégations nutritionnelles et sanitaires de leurs produits par des preuves scientifiques et il reste à présent très difficile d'obtenir ces autorisations.

## **II. Les Probiotiques**

### **A. Définitions**

Le terme probiotique vient du grec, « pro bios » et signifie « pour la vie ». Lilly et Stillwell ont utilisé ce terme en 1965 pour la première fois afin de décrire des substances sécrétées par un micro-organisme stimulant la croissance d'un autre micro-organisme (Lilly and Stillwell, 1965). Depuis, la FAO (*Food and Agricultural Organization*) et l'OMS ont défini les probiotiques comme étant « tout micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité adéquate, a des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2001).

Pour qu'un micro-organisme soit classé comme probiotique, il doit remplir les critères suivants (*Pour revue Dunne et al., 2001*) :

- avoir un effet bénéfique démontré sur l'hôte
- être non pathogène et sans effets indésirables
- survivre aux acides gastriques et biliaires pour persister dans l'intestin
- adhérer aux cellules intestinales
- réduire l'adhésion des pathogènes en produisant des peptides anti-microbiens
- avoir un effet sur le système immunitaire
- survivre et rester stable suite aux procédés de production

Le fait que les bactéries doivent être vivantes et capables d'adhérer pour avoir des effets bénéfiques est actuellement contesté, puisque des souches inactivées par la chaleur sont capables d'avoir ces effets (Zhang et al., 2005).

### **B. Souches utilisées**

Les probiotiques comprennent principalement des bactéries lactiques à Gram positif du genre *Lactobacillus* et des bifidobactéries. D'autres bactéries, comme décrit précédemment pour la souche *E. coli* Nissle 1917, certaines souches de *Streptococcus*, de *Bacillus* et des levures du genre *Saccharomyces* (Tableau 3) sont également considérées comme

probiotiques. Elles doivent avoir reçu le statut QPS (présomption d’innocuité reconnue) dans la liste de microorganismes recommandée par l’EFSA.

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Autres
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>E. coli</i> Nissle 1917
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. animalis</i>		<i>P. freudenreichii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>		
<i>L. casei</i>			Cocktail VSL#3
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. salivarius</i>			
<i>L. crispatus</i>			
<i>L. brevis</i>			

**Tableau 3 : Principaux probiotiques utilisés chez l’homme.** *L. Lactobacillus*, *B. Bifidobacterium*, *E. Escherichia*, *S. Saccharomyces*, *P. Propionibacterium* (Adapté de Alvarez-Olmos and Oberhelman, 2001; Holzapfel et al., 2001).

### C. Les effets bénéfiques des probiotiques

Les probiotiques sont décrits dans la littérature comme ayant des effets bénéfiques, seuls ou en mélange, sur l’immuno-modulation et les inflammations, dans des troubles du système digestif, comme dans les diarrhées chez les enfants (Christensen et al., 2002; Guarino et al., 1997; Majamaa et al., 1995), dans des infections à *Helicobacter pylori* (Aiba et al., 1998; Kabir et al., 1997) et dans des allergies alimentaires et respiratoires (Dennis-Wall et al., 2017; Liu et al., 2016; Neau et al., 2016). Ils protègent également des complications post-opératoires du by-pass (Woodard et al., 2009) et diminuent le risque de cancer colorectal (Rafter et al., 2007). Des souches probiotiques peuvent avoir une activité antimicrobienne (Karska-Wysocki et al., 2010) et inhiber la croissance, l’activité métabolique et l’adhésion aux cellules intestinales des bactéries entéropathogènes telles que *Salmonella*, *Shigella* ou *E. coli* (Coconnier et al., 1997; Gopal et al., 2001; Hudault et al., 1997).

## 1. Utilisation des probiotiques dans les maladies inflammatoires de l'intestin

Si de nombreuses recherches scientifiques s'intéressent aux MICI, aucun traitement n'offre aujourd'hui de véritable guérison et les approches thérapeutiques classiques sont souvent associées à des effets secondaires ou à une absence de réponse pour certains patients. Une dysbiose du microbiote étant souvent constatée chez les patients atteints de MICI avec notamment une diminution de Lactobacilles et de Bifidobacteries, l'utilisation des probiotiques a donc été proposée comme une alternative thérapeutique intéressante.

Une méta-analyse systématique des études cliniques réalisées chez l'humain avec des probiotiques, prébiotiques ou symbiotiques a récemment synthétisé les résultats de 14 études chez des patients atteints de MC, 21 études chez des patients atteints de RCH et 5 chez des patients ayant une pochite (Ghoury et al., 2014). Les données mettent en lumière de façon globale des effets bénéfiques chez les patients souffrant de RCH mais également dans le traitement de pochite après rémission induite par un traitement antibiotique. Par contre, très peu de résultats significatifs ont été rapportés pour le traitement de la MC. La majorité des études pour la RCH ont été réalisées à l'aide du mélange VSL#3 contenant 8 souches différentes (Ng et al., 2010; Sood et al., 2009; Tursi et al., 2004, 2010). La souche *E. coli* Nissle 1917 a également un effet reconnu dans le traitement de la RCH, avec une diminution du taux de rechute similaire à celui de la mésalazine (Kruis et al., 2004), de même que la souche *L. rhamnosus* GG (Zocco et al., 2006) ou encore un mélange de *B. breve*, *B. bifidum* et *L. acidophilus* qui diminue les manifestations cliniques de la maladie (Ishikawa et al., 2003). Dans le cas de la maladie de Crohn, le potentiel bénéfique est moins documenté : la souche *L. rhamnosus* GG n'a aucun effet protecteur sur les patients (Schultz et al., 2004). Des effets de diminution des rechutes ont été observés après administration quotidienne de la souche *E. coli* Nissle 1917 dans une cohorte de 28 patients allemands (Malchow, 1997). De même, l'administration de la levure *Saccharomyces boulardii* en combinaison avec la mésalazine diminue le risque de rechute, comparé à la mésalazine seule (Guslandi et al., 2000). Ces études montrent un rôle thérapeutique des probiotiques potentiellement intéressant pour la RCH, mais relativement limité pour la MC, avec des effets souche spécifique. Des études supplémentaires et une meilleure sélection des souches sont donc nécessaires.

## 2. Impact des probiotiques dans l'obésité

L'obésité, comme décrit précédemment, est reconnue comme une maladie multifactorielle caractérisée par une dysbiose du microbiote : l'utilisation de probiotiques semble donc là encore une alternative intéressante. L'effet souche spécifique est retrouvé dans l'obésité et leur effet est à double face. De nombreux probiotiques sont en effet utilisés dans l'alimentation animale dans le but de limiter l'utilisation d'antibiotiques et de maintenir leur bien-être, conduisant de ce fait à améliorer leur croissance donc leur prise de poids. Des *Lactobacillus* spp. sont fréquemment utilisés dans les élevages de poulets (Raoult, Nature 2010; Angelakis and Raoult, 2010). Les effets sont différents selon les espèces et souches utilisées, certaines sont associées à une augmentation de la prise de poids, d'autres à une perte de poids. Une méta-analyse réalisée à partir de 51 études chez des animaux de ferme et 17 études cliniques randomisées chez l'homme indique que certaines espèces (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. ingluviei*) sont associées à des augmentations significatives du gain de poids chez les animaux, contrairement à des souches de *L. gasseri* qui entraînent des pertes de poids à la fois chez l'homme et chez l'animal (Million et al., 2012). Une autre méta-analyse (Sáez-Lara et al., 2016) (Tableau 4) regroupant les études cliniques chez l'homme a reporté que certaines souches probiotiques bien étudiées n'ont eu aucun impact, par exemple chez des adolescents obèses ayant reçu la souche *L. salivarius* Ls33, bien que son administration ait conduit à des modifications intéressantes de la composition du microbiote (Gøbel et al., 2012; Larsen et al., 2013). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par notre étude chez la souris (*cf* Article 1, Alard et al., 2016). Des résultats négatifs ont été également observés avec la souche *L. paracasei* F19 chez des femmes obèses (Brahe et al., 2015). A l'inverse, deux études ont mis en évidence les effets positifs de la souche *L. gasseri* SBT2055, isolée de flore humaine et connue pour avoir des propriétés sur la tolérance biliaire et la déconjugaison des acides biliaires. Cette souche a conduit à une réduction de l'IMC et de la masse grasse sous-cutanée et viscérale chez les sujets obèses par rapport au groupe contrôle (Kadooka et al., 2010, 2013). Des effets similaires ont été observés avec d'autres probiotiques (Tableau 4) dont une souche de *L. plantarum* (Sharafedinov et al., 2013) et un mélange de *L. acidophilus* La5, *B. lactis* Bb12 et *L. casei* DN001 (Zarrati et al., 2013a, 2013b, 2014). La souche *L. rhamnosus* CGMCC1.3724 a été aussi capable d'aider des femmes obèses à perdre du poids lors d'un régime et à maintenir cette perte, ainsi qu'à diminuer leur masse grasse et leurs taux de leptine comparativement au groupe placebo (Sanchez et al., 2014).

Référence	Nombre de sujets	de	Souche et dose administrée	Durée du traitement	Effets observés
Larsen et al., 2013	51 adolescents obèses		<i>L. salivarius</i> Ls33 10 <sup>10</sup> CFU	12 semaines	Augmente les taux de <i>Bacteroides Prevotellae</i> et <i>Porphyromonas</i>
Gøbel et al., 2012	50 adolescents obèses		<i>L. salivarius</i> Ls33 10 <sup>10</sup> CFU	12 semaines	Pas d'effet sur l'inflammation ou le syndrome métabolique
Kadooka et al., 2010	87 sujets à BMI élevé		<i>L. gasseri</i> SBT2055 5 × 10 <sup>10</sup> CFU	12 semaines	Diminution du poids, du tour de taille et du tissu adipeux viscéral et augmentation du taux d'adiponectine
Kadooka et al., 2013	210 adultes avec un grand tour de taille		<i>L. gasseri</i> SBT2055 10 <sup>8</sup> CFU	12 semaines	Diminution de l'IMC, du tour de taille et du tissu adipeux viscéral
Sharafedinov et al., 2013	40 adultes obèses		<i>L. plantarum</i> 1.5 × 10 <sup>11</sup> CFU/g	3 semaines	Diminution de l'IMC et de la pression artérielle
Zarrati et al., 2013a, 2013b, 2014	75 sujets à BMI élevé		<i>L. acidophilus</i> La5, <i>B. lactis</i> Bb12, and <i>L. casei</i> DN001 10 <sup>8</sup> CFU/g	8 semaines	Changement de l'expression des gènes pro-inflammatoire dans les cellules immunes du sang, diminution de l'IMC, diminution du taux global de gras et du taux de leptine
Agerholm-Larsen et al., 2000	70 sujets obèses ou en surpoids		<i>E. faecium</i> et deux souches de <i>S. thermophilus</i>	8 semaines	Diminution du poids, de la pression artérielle, des LDL et augmentation des taux de fibrine
Rajkumar et al., 2014	60 adultes en surpoids		Mélange VSL#3	6 semaines	Amélioration du métabolisme des lipides, de la sensibilité à l'insuline, et diminution de la CRP (facteur inflammatoire)
Brahe et al., 2015	58 femmes postménopauses obèses		<i>L. paracasei</i> F19 9,4 × 10 <sup>10</sup> CFU	6 semaines	Pas d'effet
Ivey et al., 2014, 2015	156 adultes en surpoids		<i>L. acidophilus</i> La5 et <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12	6 semaines	Reduction du taux basal de glucose et augmentation de l'HOMA-IR

**Tableau 4 : Résumé des études cliniques portant sur l'effet potentiel des probiotiques chez des sujets obèses ou en surpoids sévère.** IMC indice de masse corporelle, CFU colony forming unit, CRP C-reactive protein.

Les Bifides ont largement été étudiées dans des modèles murins : la souche *B. animalis* subsp. *lactis* GCL2505 améliore la tolérance au glucose en modulant le microbiote et en augmentant la production d'acétate et de GLP-1 (Aoki et al., 2017). Chez les rats obèses, l'administration du *B. lactis* BB12 limite la prise de poids et améliore le syndrome métabolique, mais également leur dysbiose intestinale (Bomhof et al., 2014).

Les probiotiques peuvent être également administrés en mélange. En effet, nos travaux ont montré que l'administration combinée d'un *L. rhamnosus* LMG S-28148 et d'un *B. animalis* subsp *lactis* LMG P-28149 est capable de limiter fortement le gain de poids, de diminuer la



résistance à l'insuline et de restaurer la dysbiose du microbiote dans un modèle murin d'obésité induite par un régime riche en graisse (Alard et al., 2016, cf partie Résultats Article 1).

L'administration de probiotiques sous d'autres formes est également utilisée. L'administration quotidienne de *L. acidophilus* La5 et *B. lactis* BB12 sous forme de yaourt diminue le taux de cholestérol total et les risques athérogènes associés au diabète de type 2 (Ejtahed et al., 2011). De façon intéressante, des fromages fabriqués avec des probiotiques sont capables de réduire les symptômes du syndrome métabolique, la prise de poids et les risques cardio-vasculaires, s'il contiennent par exemple la souche *L. plantarum* TENSIA et 26% de gras, comparativement à des fromages normaux (Sharafedinov et al., 2013).

## **D. Mécanismes d'action des probiotiques**

Pour apporter leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent être administrés de façon quotidienne et régulière. Ils vont ainsi avoir plusieurs cibles. Certains mécanismes jouent sur la diminution du pH intestinal, la production de substances antibactériennes, l'adhérence des pathogènes et la fonction barrière de l'épithélium ou encore la modulation du système immunitaire et des fonctions métaboliques. Les probiotiques influencent également la composition du microbiote.

### **1. Le renforcement de la barrière**

L'intégrité de la barrière intestinale est importante, si la barrière est perturbée les bactéries pathogènes ont plus de chances d'induire des états inflammatoires. Les probiotiques sont capables d'avoir un effet protecteur sur l'intégrité de la barrière intestinale en renforçant les jonctions serrées. *In vitro* la souche *L. plantarum* MB452 composant le VSL#3 est capable de renforcer la barrière en augmentant spécifiquement l'expression des gènes des jonctions tels que ZO-1, ZO-2 et les occludines (Anderson et al., 2010), de même que les souches *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* PZ1041, *L. gasseri* PZ1160, *L. fermentum* PZ1121 et *E. coli* Nissle 1917 (Hummel et al., 2012; Zyrek et al., 2007). De la même manière, la souche *E. coli* Nissle 1917 est capable de réparer l'épithélium après une rupture due par exemple à la souche enthéropathogène *E. coli* E2348/68 en réarrangeant les protéines qui forment les jonctions serrées et les protéines kinase C (Zyrek et al., 2007).

Les probiotiques peuvent également prévenir les dommages épithéliaux induits par le stress oxydatif ou les concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires comme c'est le cas dans les MICI (Sartor, 2006). Le *L. rhamnosus* GG *in vitro* protège les cellules de côlon humaines et murines de l'apoptose *via* la production de peptides p40 et p75 (Lam et al., 2007; Yan et al., 2007).

## 2. Modulation du système immunitaire

Les probiotiques sont capables de moduler l'immunité adaptative et innée, par l'expression à leur surface de ligands reconnus par les récepteurs TLR, NLR et CLR des cellules immunes de l'hôte et d'activer des voies de signalisation bénéfiques.

Les probiotiques peuvent agir sur les cellules épithéliales et moduler leur production de cytokines. Par exemple, *in vitro* le *L. rhamnosus* GG est capable de diminuer la production d'IL-8 induite par du TNF- $\alpha$  en bloquant la translocation de NF- $\kappa$ B (Zhang et al., 2005) ; *in vivo* le *B. longum* HY8004 et le *L. plantarum* AK8-4 inhibent la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans les cellules épithéliales du côlon suite à l'induction d'une colite par le TNBS (Lee et al., 2009).

Les probiotiques peuvent moduler la maturation des cellules dendritiques et leur production de cytokines, de façon souche spécifique (Christensen et al., 2002; Foligne et al., 2007a). Par exemple, le *L. salivarius* Ls33 n'induit qu'une maturation partielle des cellules dendritiques murines dérivées de moelle osseuse, alors que le *L. acidophilus* NCFM induit une différenciation totale de ces cellules, avec une forte expression des marqueurs d'activation (CMH II) et de co-stimulation (CD40 et CD80/CD86) associée à une production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et IL-12 (Foligne et al., 2007a).

Les probiotiques sont également capables de moduler les réponses Th1, Th2 ou Th17 Les bactéries lactiques ont plusieurs mécanismes d'action dont des capacités d'immunomodulation. Lorsqu'elles sont mises en contact avec des cellules immunes PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), elles sont capables d'induire la production de différents taux de cytokines et peuvent être ainsi cataloguées :

- bactéries activant la sécrétion de beaucoup d'IL-10 et peu d'IL-12 ;
- bactéries activant la sécrétion de beaucoup d'IL-12 et peu d'IL-10 ;
- bactéries activant la sécrétion des deux en quantité moyenne.

Par exemple *in vitro* le *L. rhamnosus* est capable de moduler la différenciation de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains en diminuant la différenciation des lymphocytes en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et la sécrétion d'IL-2, IL-4 et IL-10. Chez des individus sains, la même souche administrée pendant deux semaines réduit la production d'IL-4, IL-2 et IL-10. Chez des individus atteints de la maladie de Crohn, l'administration de *L. rhamnosus* pendant deux semaines diminue leur taux d'IL-2 mais également leur taux d'IFN- $\gamma$ . Le probiotique *L. rhamnosus* est capable de moduler les réponses Th1 et Th2 par son action anti-inflammatoire (Braat et al., 2004).

Un lien existe entre les capacités anti-inflammatoires *in vitro* et les effets protecteurs *in vivo* des souches probiotiques, démontré notamment dans les modèles murins de colite induite par le TNBS (*2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid*) (Foligne et al., 2007b).

### 3. Les effets antimicrobiens des probiotiques

Le microbiote peut être influencé par les probiotiques *via* leurs capacités à produire des substances antimicrobiennes.

La sécrétion par les probiotiques d'acides organiques tels que les acides lactique, acétique ou butyrique, contribue à l'abaissement du pH intestinal et inhibe ainsi la croissance de bactéries de types entéropathogènes et uropathogènes (Cadieux et al., 2009). Par exemple la souche *L. rhamnosus* GG induit la production d'acide lactique *in vitro* et inhibe la croissance de *Salmonella typhimurium* (Keersmaecker et al., 2006).

Les probiotiques sont également capables de produire du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines. Les bactériocines sont des petites protéines de 2 à 6 kDa, qui servent à l'implantation des probiotiques en modifiant l'environnement et donc en éliminant les pathogènes (Gillor et al., 2009). Elles forment des pores et inhibent la synthèse de la paroi cellulaire des pathogènes (Corr et al., 2007). Par exemple les souches *L. acidophilus* CL1285 et *L. casei* LBC80R produisent respectivement la lactacine B ou F et la caseine 80 et font ainsi preuve d'une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline (MRSA) (Karska-Wysocki et al., 2010). De la même manière la souche *L. salivarius* UCC118 est capable dans des modèles murins de protéger de manière préventive d'infections par *Listeria monocytogenes* *via* la production de la bactériocine Abp118 (Corr et al., 2007). Les souches *L. reuteri* DSM 17938 et ATCC PTA 5289, de par leur production de

peroxyde d'hydrogène, possèdent une activité antifongique *in vitro* contre les levures du genre *Candida* de manière souche spécifique (Jørgensen et al., 2017).

Une des caractéristiques des probiotiques est l'adhérence aux cellules épithéliales de l'intestin, même si ce critère est discuté à l'heure actuelle. De part cette capacité, ils peuvent entrer en compétition avec les pathogènes au niveau des sites d'attachement à la surface des cellules et empêcher ainsi la colonisation par ceux-ci. *In vitro*, deux souches, *L. rhamnosus* R0011 et *L. acidophilus* R0052, sont capables d'adhérer à une monocouche de cellules épithéliales humaines T84 lors d'un prétraitement et d'inhiber l'adhésion de deux souches entéropathogènes de *E. coli* (Sherman et al., 2005).

En plus de ce mécanisme de protection, les probiotiques favorisent la production de mucines. *In vitro*, le *L. plantarum* 299v et le *L. rhamnosus* GG induisent l'expression et la production de *MUC2* et *MUC3* par des cellules épithéliales humaines HT29 bloquant ainsi l'installation d'un *E. coli* entéropathogène (Mack et al., 1999). Des études *in vitro* et *in vivo* ont également montré que le mélange VSL#3 augmente la sécrétion de *MUC2* et que ce phénomène serait dû en particulier aux lactobacilles du mélange (Caballero-Franco et al., 2007).

La production de défensines des cellules de Paneth peut également être influencée par les probiotiques, notamment le mélange VSL#3 et *E. coli* Nissle 1917 qui sont capables d'influencer la production de la  $\beta$ -défensine 2 humaine (Möndel et al., 2008; Schlee et al., 2008).

#### **4. Modulation de la composition du microbiote**

En 1989, Fuller a suggéré que les probiotiques seraient capables d'avoir des effets bénéfiques en modifiant la composition de la flore (Fuller, 1989). Il a ensuite été démontré que l'administration de probiotiques changeait la composition bactérienne chez des sujets sains : par exemple la consommation de *L. casei shirota* (Spanhaak et al., 1998) ou de *L. johnsonii* La1 (Yamano et al., 2006) est capable de diminuer la diversité des entérobactéries et d'augmenter les lactobacilles et bifidobactéries. Chez la souris, l'administration de *L. casei* et de *L. plantarum* augmente le nombre de lactobacilles dans le côlon (Fuentes et al., 2008).

Les patients souffrants de MICI présentent une dysbiose du microbiote caractérisée par une diminution des *Firmicutes* (*F. prausnitzii*), des bifidobactéries, des lactobacilles et une augmentation des *Bacteroides* tels que le *B. vulgatus* et des *E. coli* pro-inflammatoires (Manichanh et al., 2006; Rehman et al., 2010; Sokol et al., 2008). La consommation de lait fermenté à base de bifidobactéries par des patients souffrant de RCH réduit le taux de *B. vulgatus* pro-inflammatoire (Ishikawa et al., 2003). De même le mélange commercial VSL#3 est capable, dans des modèles expérimentaux murins de colite induite, de modifier la composition du microbiote en augmentant le taux de bifidobactéries dans le caecum des animaux (Gaudier et al., 2005)

L'obésité, comme décrit précédemment, est caractérisée également par une dysbiose du microbiote, notamment une diminution du rapport *Bacteroidetes/Firmicutes*. Un effet des probiotiques sur la flore est observé. En effet dans des modèles d'obésité induite chez le rat, l'administration de la *B. lactis* BB12 en combinaison avec un prébiotique restaure cette dysbiose en augmentant l'abondance des bifidobactéries et des lactobacilles (Bomhof et al., 2014). De la même manière, l'administration de *B. animalis* subsp. *lactis* GCL2505 augmente le nombre de bifidobactéries dans le caecum de souris obèses (Aoki et al., 2017). Au cours de nos travaux, nous avons montré chez la souris qu'un mélange de *L. rhamnosus* LMG S-28148 et de *B. lactis* LMG P-28149 est capable de restaurer la dysbiose du microbiote et en particulier de restaurer l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* et de *Ricknellaceae* fortement diminuées chez les souris obèses (Alard et al., 2016).

## OBJECTIFS

Des dysbioses du microbiote sont observées dans de nombreuses pathologies chroniques dont les MICI et l'obésité. Ces deux pathologies sont associées à une inflammation plus ou moins importante et à une perturbation de la barrière intestinale. L'utilisation de probiotiques a donc été proposée comme une alternative intéressante aux traitements médicamenteux, cependant les résultats sont clairement souche-dépendants et une sélection efficace des souches doit donc être entreprise avant toute investigation clinique.

Nos travaux ont tout d'abord débuté par l'étude d'un mélange de deux souches composées d'un bifide et d'un lactobacille dans le contexte de l'obésité. Cette étude a été soutenue par la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), puis a suscité l'intérêt de la société Vésale Pharma. Nos travaux ont visé à étudier l'impact de l'administration quotidienne de ces deux souches dans un modèle murin d'obésité liée à la consommation d'un régime hypercalorique riche en graisse (HFD). Ils nous ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques de ce mélange et d'identifier un certain nombre de mécanismes impliqués (Alard et al., *Environmental Microbiology*, 2016).

La société PiLeJe nous a ensuite sollicités pour étudier certaines souches de leur collection (24 souches), à la fois dans le contexte des MICI et de l'obésité. Ce travail a donc bénéficié du soutien de PiLeJe par l'obtention d'une bourse CIFRE. Pour des raisons éthiques et de lourdeur expérimentale, il nous fallait cribler ces souches *in vitro* pour sélectionner les plus performantes et confirmer leur potentialité avant de les évaluer dans des modèles expérimentaux *in vivo*. A cette fin, nous avons développé plusieurs modèles de criblage *in vitro*.

L'étude *in vitro* des capacités anti-inflammatoires couplée à un modèle de barrière intestinale, nous a permis de sélectionner six souches que nous avons ensuite évaluées *in vivo* dans des modèles murins de colites aiguë et chronique induites par l'administration de TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique). Ces travaux nous ont permis de montrer que les souches performantes dans le modèle aiguë n'ont pas la même efficacité dans le modèle chronique et réciproquement (Alard et al, soumis à *Beneficial Microbes*).

Il n'existait aucun modèle *in vitro* prédictif de l'effet potentiel des souches dans le contexte de l'obésité. Nous avons de ce fait mis en place divers modèles pour sélectionner les souches les plus performantes. Tout comme pour les MICI, nous avons sélectionné les souches selon leur capacité anti-inflammatoire et leur capacité à restaurer la barrière intestinale. Nous avons également développé des modèles cellulaires *in vitro* nous permettant d'évaluer la capacité des souches à induire des peptides entéro-endocrines (lignée murine de cellules endocrines STC-1) et à limiter l'accumulation des lipides au niveau des adipocytes (lignée pré-adipocytaire 3T3-L1). Nous avons ensuite évalué les souches les plus performantes à l'aide d'un modèle murin d'obésité liée à la consommation d'un régime hypercalorique riche en graisse (HFD). Nous avons pu montrer que l'effet protecteur est souche-spécifique et que certaines souches et mélanges de souches sont capables de réduire la prise de poids et de limiter significativement l'insulino-résistance, notamment en bloquant l'état inflammatoire associé au niveau du tissu adipeux.

## RESULTATS

### **Article 1 : Des probiotiques sélectionnés protègent les souris de l'obésité en remodelant le tissu adipeux et la composition du microbiote**

J. Alard, V. Lehrter, M. Rhimi, I. Mangin, V. Peucelle, A.-L. Abraham, M. Mariadassou, E. Maguin, A.-J. Waligora-Dupriet, B. Pot, I. Wolowczuk and C. Grangette.

**Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota.**

**Publié dans *Environmental Microbiology*, 2016, 18 (5) : 1484-1497**

#### **Introduction**

L'obésité est souvent associée à un état inflammatoire chronique à bas bruit, initié dans le tissu adipeux blanc (WAT) et contribuant au développement de la résistance à l'insuline et au diabète de type 2. En effet, le tissu adipeux en expansion est associé à une hypertrophie adipocytaire, à des changements dans la composition des cellules immunitaires et à une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires. L'accumulation de macrophages dans le WAT est une caractéristique de l'état pro-inflammatoire de l'obésité chez l'homme et dans les modèles murins d'obésité induite. A l'inverse, le nombre et la fréquence des cellules T régulatrices sont réduits dans le tissu adipeux. L'obésité est également associée à une dysbiose du microbiote, dont la fonction métabolique est altérée. L'utilisation de probiotiques contre l'obésité est donc apparue comme une stratégie pour moduler le microbiote

#### **Résumé des résultats**

Nous avons dans un premier temps évalué l'impact de l'administration de *Lactobacillus salivarius* Ls33, souche anti-inflammatoire de référence (Foligne et al., 2007b), sur le développement de l'obésité et du syndrome métabolique associé. Les souris soumises au régime hypercalorique (à 60% de gras) ont de manière significative pris du poids, ce qui a été associé à une augmentation des masses grasses sous-cutanée et viscérale et ont développé une intolérance au glucose, comparativement aux souris ayant reçu le régime à 10% de gras.



L'administration de la souche Ls33 n'a eu aucun effet sur ces paramètres en dépit de ses capacités anti-inflammatoires.

Dans un second temps, nous avons évalué à l'aide du même modèle d'obésité l'efficacité d'un mélange composé des souches *L. rhamnosus* LMG S-28148 et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LMG P-28149. L'administration de ce mélange a permis une diminution significative de la prise de poids et de la masse grasse, comparativement aux souris ayant reçu l'excipient. Les facteurs métaboliques tels que la glycémie et l'insulinémie chez les souris traitées sont diminués, en lien avec une réduction de l'inflammation au niveau du tissu adipeux viscéral, caractérisée notamment par un blocage du recrutement des macrophages et une augmentation des marqueurs de lymphocytes T régulateurs. Les taux d'adipokines sont également restaurés chez nos souris traitées, avec une diminution du taux de leptine circulante et une augmentation de l'adiponectine. Au niveau du foie, l'administration du mélange probiotique a limité le développement de la stéatose hépatique et amélioré l'expression des gènes de la lipogénèse et de la sensibilité à l'insuline.

Au niveau intestinal, l'effet protecteur du mélange probiotique s'accompagne d'une diminution de l'expression des gènes du métabolisme lipidique comparativement aux souris obèses non traitées, alors que l'expression des gènes codant les récepteurs aux acides gras à chaîne courte (AGCC) GPR41 et GPR43 sont restaurés. Suite à ces résultats, nous avons étudié les capacités des souches à induire la production d'AGCC *in vitro* à l'aide du modèle SHIME d'intestin artificiel intégrant un microbiote humain. L'addition du mélange de souches induit en moins de 48h une augmentation significative du taux d'AGCC total dans le côlon, avec un changement de profil marqué par une réduction du niveau d'acétate au profit d'une augmentation en propionate et en butyrate.

Nous avons de ce fait suivi l'impact du traitement probiotique chez les souris obèses grâce à une analyse par pyroséquençage de l'ARN 16S (collaboration avec l'équipe d'E. Maguin, INRA de Jouy-en-Josas). Nous avons confirmé que les souris obèses présentent une dysbiose, avec une diminution du rapport *Bacteroidetes/Firmicutes*. L'administration du mélange probiotique a entraîné une restauration partielle de l'abondance des *Bacteroidetes*, mais l'analyse plus fine des familles a révélé également une restauration des *Rikenellaceae*, dont l'abondance est inversement corrélée au gain de poids et à l'inverse une diminution des *Lactobacillaceae*, qui sont augmentés chez les souris obèses comparativement aux souris

contrôles minces. Par PCR quantitative, nous avons également mis en évidence la restauration de la population d'*Akkermansia muciniphila*, bactérie protectrice dans le contexte de l'obésité, dont l'abondance est inversement corrélée au gain de poids et positivement corrélée à l'abondance des *Rickenellaceae*.

Afin d'évaluer l'impact respectif des deux souches composant le mélange, nous les avons administrées séparément. Après 7 semaines de régime, les souris sous régime HFD ayant reçu le *B. lactis* présentaient une réduction significative de gain de poids et de masse grasse comparativement aux souris traitées par le *L. rhamnosus* qui présentaient un poids similaire aux souris contrôles (souris non traitées soumises au régime HFD). Cependant les deux souches étaient capables de limiter significativement l'expression de gènes inflammatoires dans les tissus. Seule l'administration du *B. lactis* a conduit à une restauration de l'abondance d'*A. muciniphila*.

## **Conclusion**

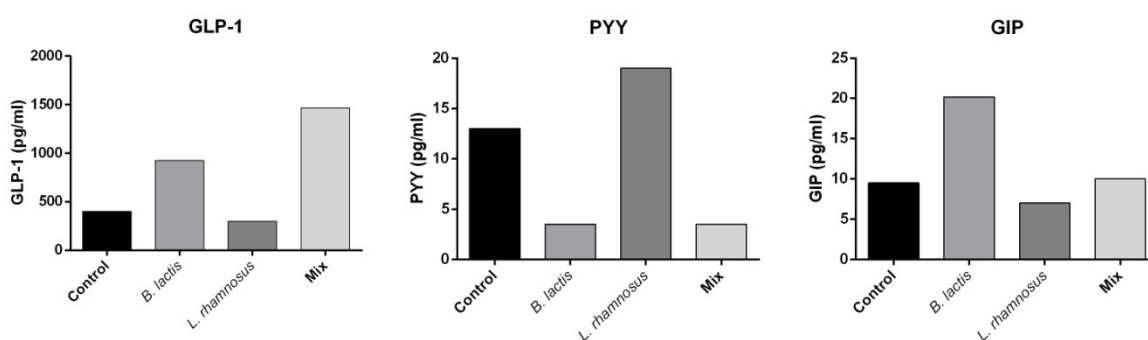
L'administration du mélange a entraîné un remodelage cellulaire au niveau du tissu adipeux, avec notamment un blocage du recrutement des macrophages, permettant de réduire significativement l'inflammation associée à l'obésité et d'améliorer la sensibilité à l'insuline et la stéatose hépatique. L'effet protecteur s'accompagne d'une amélioration de la dyslipidémie d'une augmentation de la production des AGCC et d'une amélioration de la dysbiose du microbiote, notamment *via* la restauration de l'abondance des bactéries protectrices dans le contexte de l'obésité, tel que *A. muciniphila*. L'effet protecteur semble être dissocié des capacités anti-inflammatoires des souches : la souche *B. lactis* aurait plus une action sur le métabolisme et la souche *L. rhamnosus* agirait sur l'inflammation.

## Travaux Complémentaires à l'article 1

### I. Impact des souches *Lactobacillus rhamnosus* LMG S-28148 et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LMG P-28149 sur la production de peptides entéro-endocrines

La prise alimentaire des souris traitées étant diminuée par rapport au contrôle HFD, nous avons évalué la capacité *in vitro* et *in vivo* des souches probiotiques individuellement et en mélange à induire la sécrétion de peptides entéro-endocrines impliqués dans la satiété, notamment la production de GLP-1, PYY et GIP.

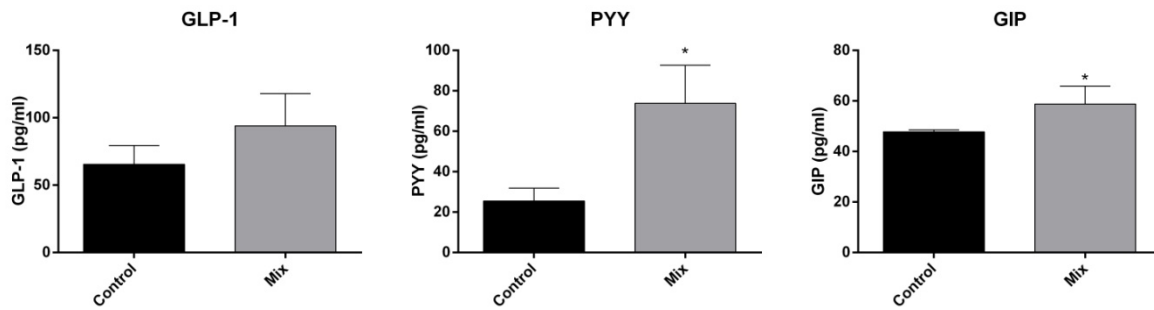
La stimulation *in vitro* des cellules de la lignée murine entéroendocrine STC-1 par les bactéries du mélange entraîne une production des peptides de manière souche dépendante. En effet la production de GLP-1 ne semble pas être induite par le *L. rhamnosus*, mais légèrement par la souche *B. lactis*. Cependant, la stimulation par le mélange des deux souches conduit à un taux de GLP-1 plus important que le contrôle (cellules traitées par l'excipient). La sécrétion de PYY et GIP ne semble pas être activée par les souches, les taux n'étant pas significativement différents et restant très bas. Néanmoins la lignée STC-1 ne semble pas être décrite dans la littérature comme capable d'induire la production de PYY et GIP.



**Figure complémentaire 1 : la stimulation *in vitro* de cellules murines endocrines STC-1 par les souches seules ou en mélange induit la sécrétion de peptides de satiété.**

*In vivo*, nous avons regardé l'induction de peptides entéro-endocrines suite à l'administration orale de glucose (effet incrétine) chez des souris ayant été traitées (ou non) par les probiotiques pendant 4 jours. Nous avons mesuré à la veine porte la sécrétion des peptides de satiété suite à un bolus de glucose (après 15 mn de gavage). L'administration du

mélange augmente significativement la sécrétion des peptides PYY et GIP par rapport au contrôle glucose et entraîne également une augmentation de GLP-1, néanmoins non significative.



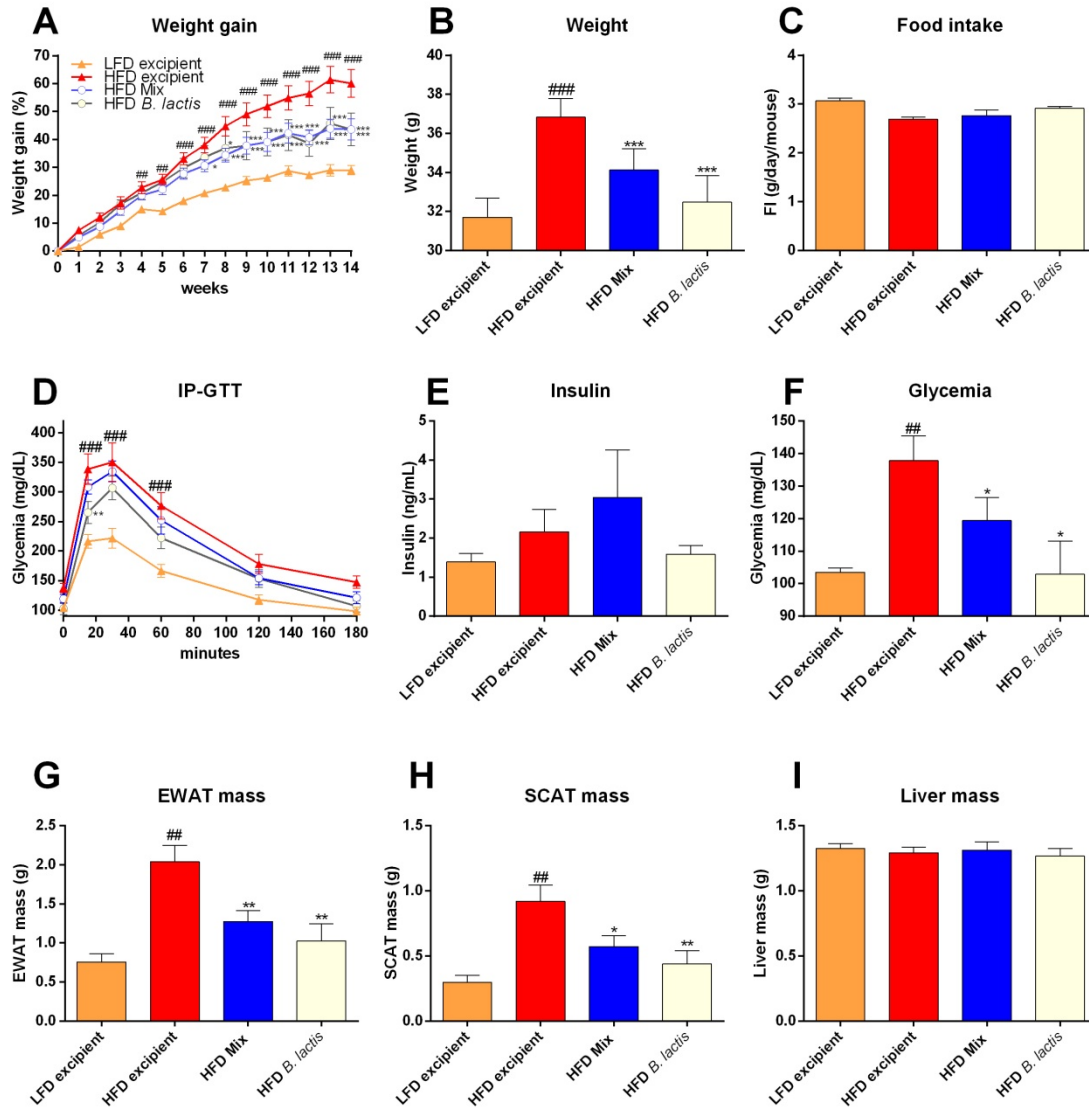
**Figure complémentaire 2 : activation *in vivo* de l'effet incrétine par le mélange.**

## **II. Impact de l'administration des souches *L. rhamnosus* LMG S-28148 et *B. animalis* subsp. *lactis* LMG P-28149 dans un modèle murin d'obésité induite par la consommation d'un régime à 45% de gras**

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de l'administration du mélange ou de la souche individuelle *B. lactis* dans un modèle d'obésité induite par la consommation d'un régime hyperlipidique à 45% de gras, moins drastique que le régime à 60% de gras, dans lequel nous pourrions mieux voir les effets des souches probiotiques.

Dans un premier temps, nous avons suivi le poids des souris. Les souris soumises au régime HFD prennent plus de poids que les souris contrôles LFD, mais de façon moindre que lors du précédent régime. L'administration du mélange et de la souche seule limite la prise de poids par rapport aux souris témoins HFD, de façon significative à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de régime (Fig C3A et C3B). Nous n'avons pas noté de modification de la prise alimentaire (Fig C3C). Lors d'un test de tolérance au glucose, les souris HFD traitées par l'excipient (contrôle HFD excipient) présentent une perte de tolérance au glucose (glycémie moins contrôlée) comparativement aux souris contrôles soumises au régime LFD. L'administration du *B. lactis* seul et du mélange entraîne une réduction significative de la glycémie basale après 14 semaines de régime, comparativement au contrôle excipient (Fig C3E et C3F), par contre seule l'administration de la souche *B. lactis* permet un contrôle significatif de la glycémie lors du test de tolérance, indiquant une amélioration de la sensibilité à l'insuline qui n'est pas significative avec le mélange (Fig C3D). Les probiotiques n'ont pas d'effet sur l'insulinémie à jeun.

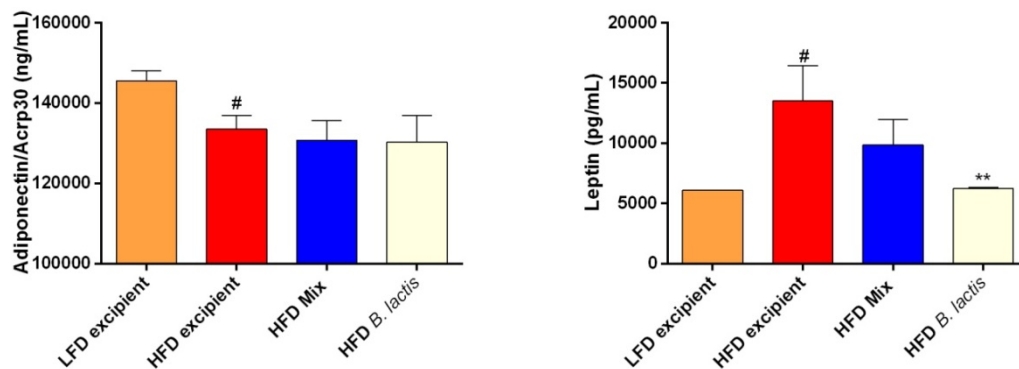
L'administration du mélange et de la souche *B. lactis* seule a également un effet sur le poids des tissus adipeux viscéraux et sous cutanés. Leur masse est réduite significativement par rapport à celle des souris du groupe témoin HFD (Fig C3G et C3H). Le régime HFD 45% n'augmente pas la masse du foie et n'induit pas de stéatose hépatique (Fig C3I).



**Figure complémentaire 3 : le mélange probiotique et la souche *B. lactis* seule améliore le gain de poids corporel, améliorent partiellement l'homéostasie du glucose et limite le développement des tissus adipeux.** (A) Gain de poids (%) des souris recevant soit les bactéries soit l'excipient sous régime LFD ou HFD pendant 14 semaines. (B) Poids final (g). (C) Prise alimentaire cumulative (g/jour/souris). (D) Test de tolérance au glucose intra-péritonal (IP-GTT) après 12 semaines de régime. Le taux de glucose sanguin (mg/dl) est mesuré après injection intra-péritonéale de glucose. (E, F) Le taux d'insuline et la glycémie sont mesurés à jeun après 14 semaines de régime. (G, H, I) Poids des tissus adipeux viscéral et sous-cutané et du foie (en g).

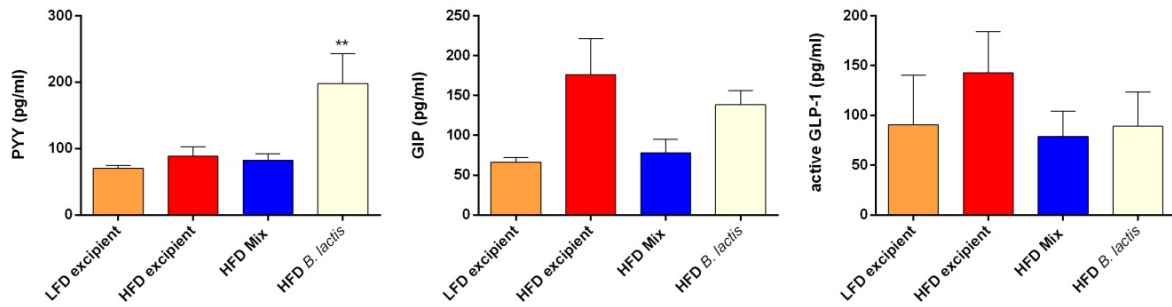
Les résultats sont représentés en moyenne  $\pm$  S.E.M (n=4 à 8 souris par groupe) # correspond à l'effet du régime (LFD vs HFD), \* correspond à l'effet du traitement (probiotiques vs excipient). \*  $p < 0.05$  \*\* ou ##  $p < 0.01$  \*\*\* ou ####  $p < 0.001$ .

Les taux de leptine et d'adiponectine plasmatiques ont été mesurés, indiquant que le régime HFD à 45% de gras induit bien de façon significative une diminution du taux d'adiponectine et une augmentation du taux de leptine chez les souris soumises à ce régime. L'administration du mélange et de la souche seule n'ont pas d'effet sur le taux d'adiponectine, en revanche nous pouvons observer une amélioration du taux de leptine, avec une diminution quasi similaire au témoin normo-pondéral pour les souris traitées par la souche *B. lactis* seule (Fig C4).

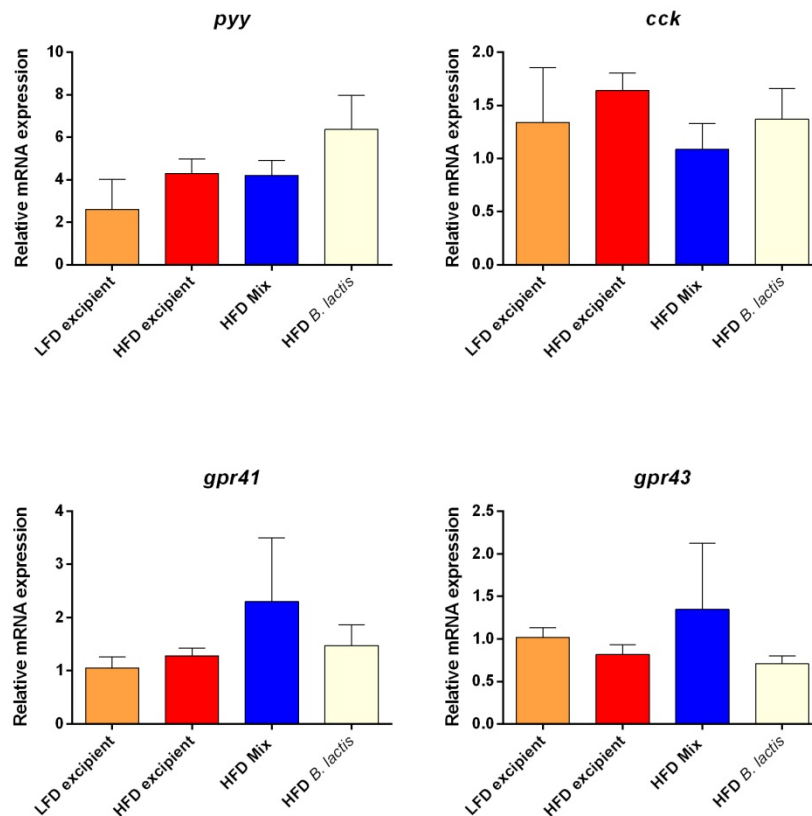


**Figure complémentaire 4 : la souche *B. lactis* améliore les taux circulant de leptine.** Les taux de leptine et d'adiponectine circulant sont mesurés dans le plasma récupéré à la veine porte. Les datas sont représentées en moyenne  $\pm$  S.E.M. (n=4 à 8 souris par groupe) # correspond à l'effet du régime (LFD vs HFD), \* correspond à l'effet du traitement (probiotiques vs excipient). #  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ .

Malgré l'absence d'effet sur la prise alimentaire, nous avons dosé les peptides entéro-endocrines impliqués dans la satiété au niveau du sang de la veine porte. Nous n'avons pas vu de modulation de ces peptides entre les souris contrôles LFD et HFD, mais de façon intéressante l'administration de la souche *B. lactis* seule a augmenté de manière significative la sécrétion de PYY (Fig C5). Ceci a été retrouvé en suivant l'expression génique de *pyy* au niveau du jéjunum, même si les différences ne sont pas significatives. Aucune modulation de l'expression de *ckk* n'est observée (Fig C6). Les récepteurs couplés aux protéines G impliqués notamment dans la sécrétion de ces peptides, GPR41 et 43 ne sont pas non plus modulés dans le jéjunum (Fig C6), mais nous pouvons observer une augmentation de l'expression du *gpr41* dans le duodénum suite au traitement par les probiotiques (Fig C7).

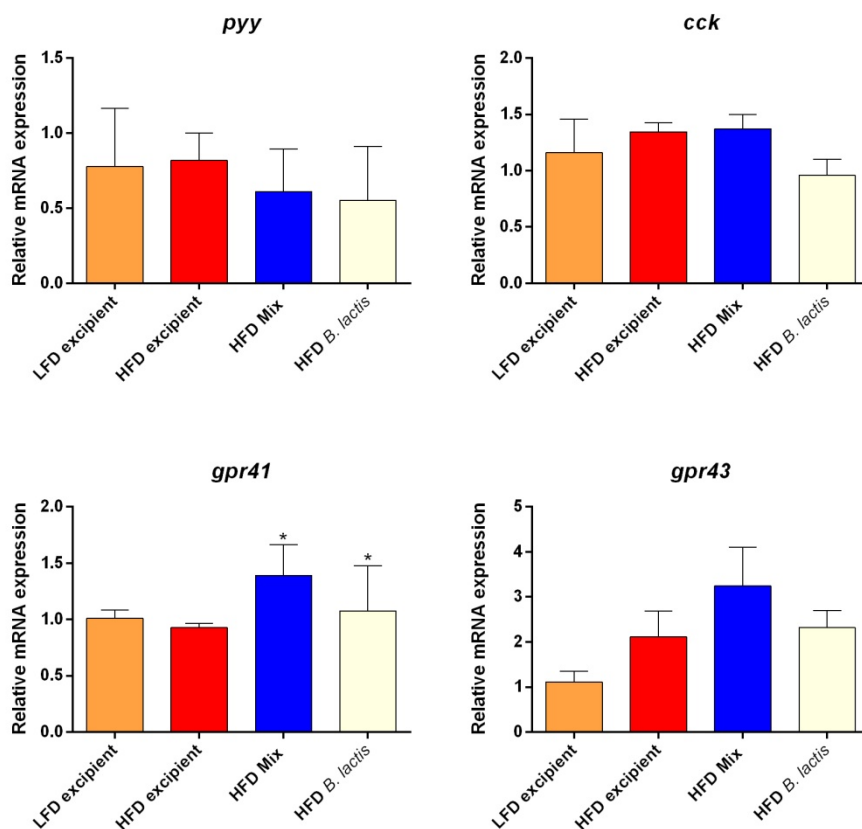


**Figure complémentaire 5 : la souche *B. lactis* augmente la sécrétion de PYY au niveau de la veine porte. PYY, GIP et GLP-1 sont dosés dans le plasma de la veine porte (méthode Luminex, Millipore) \* correspond à l'effet du traitement (probiotiques vs excipient) \*\*  $p < 0.01$ .**



**Figure complémentaire 6 : les probiotiques ne modulent pas l'expression des peptides de satiété ni les récepteurs *gpr41* et *43* dans le jéjunum (niveau d'expression par qRT-PCR).**

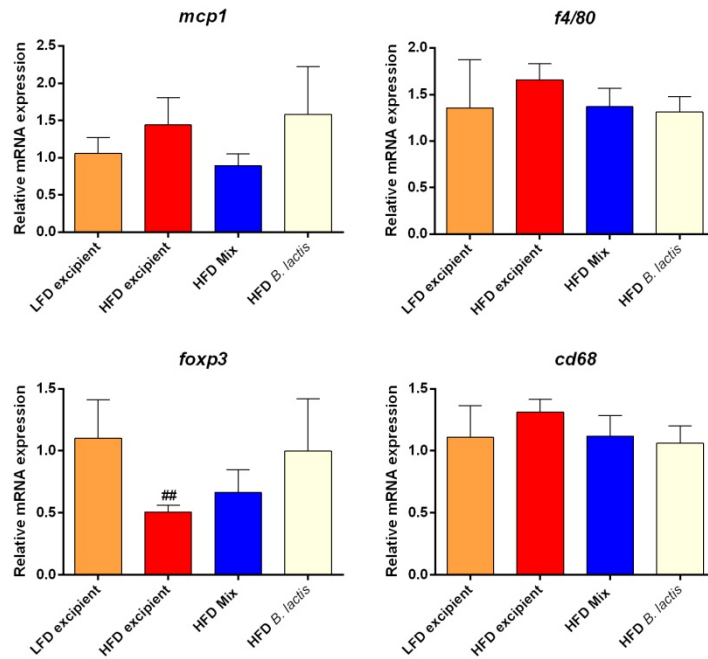




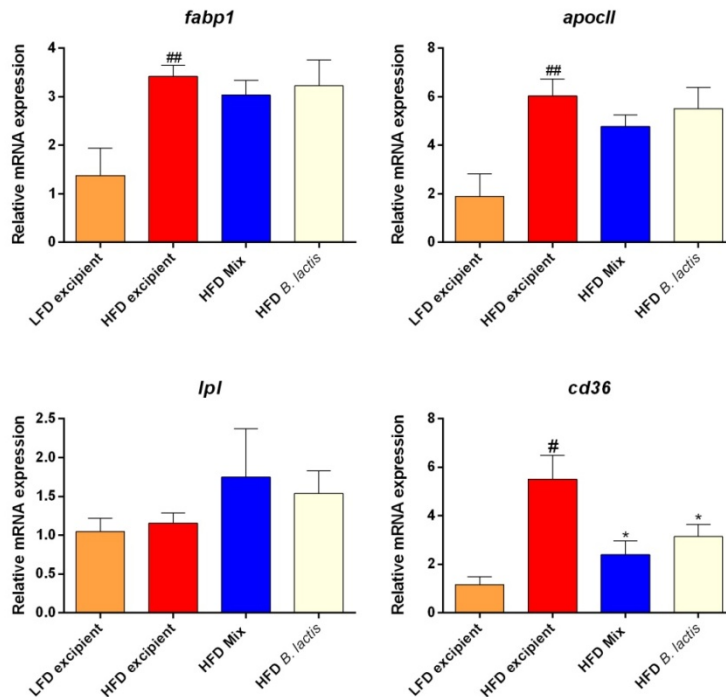
**Figure complémentaire 7 : les probiotiques modulent l'expression de *gpr41* dans le duodénum** \* correspond à l'effet du traitement (probiotiques vs excipient) \*  $p < 0.05$

Les souris obèses sous régime à 45% de gras ne présentent pas ou peu d'inflammation au niveau du jéjunum, les niveaux d'expression des différents gènes mesurés n'étant pas significativement différents de ceux des souris normo-pondérales. Le traitement par les probiotiques tend à restaurer les taux basaux d'inflammation (Fig C8). De la même manière le métabolisme lipidique dans le jéjunum est partiellement altéré lors de la consommation d'un régime hyperlipidique à 45% de gras. Les probiotiques restaurent partiellement ce déséquilibre (Fig C9). L'administration des probiotiques est également capable dans le duodénum d'augmenter l'expression du gène du récepteur aux acides biliaries TGR5 (Fig C10).

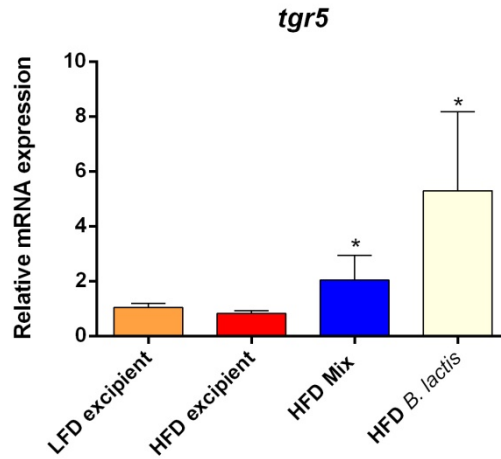
Aucune modification d'expression des différents gènes évalués n'a été observée dans le foie et dans le tissu adipeux sous-cutané (résultats non montrés).



**Figure complémentaire 8 : Expression de différents gènes inflammatoires et régulateurs au niveau du jéjunum # correspond à l'effet du régime (LFD vs HFD), ## p<0.01**

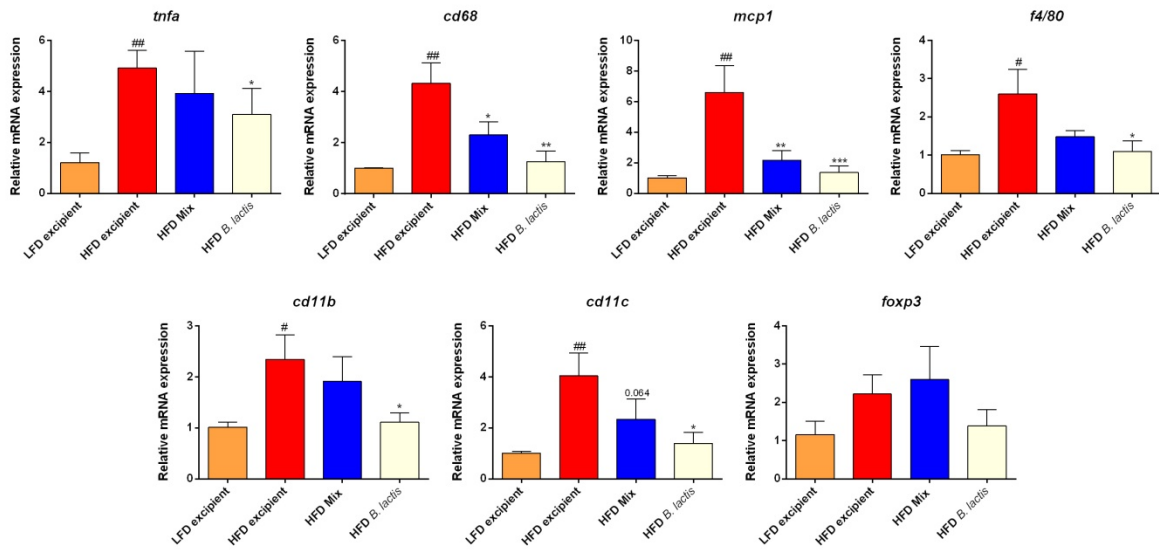


**Figure complémentaire 9 : l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides au niveau du jéjunum est partiellement modulée par la consommation d'un régime hyperlipidique # correspond à l'effet du régime (LFD vs HFD), \* correspond à l'effet du traitement (probiotiques vs excipient). \* ou # p<0.05 ## p<0.01**

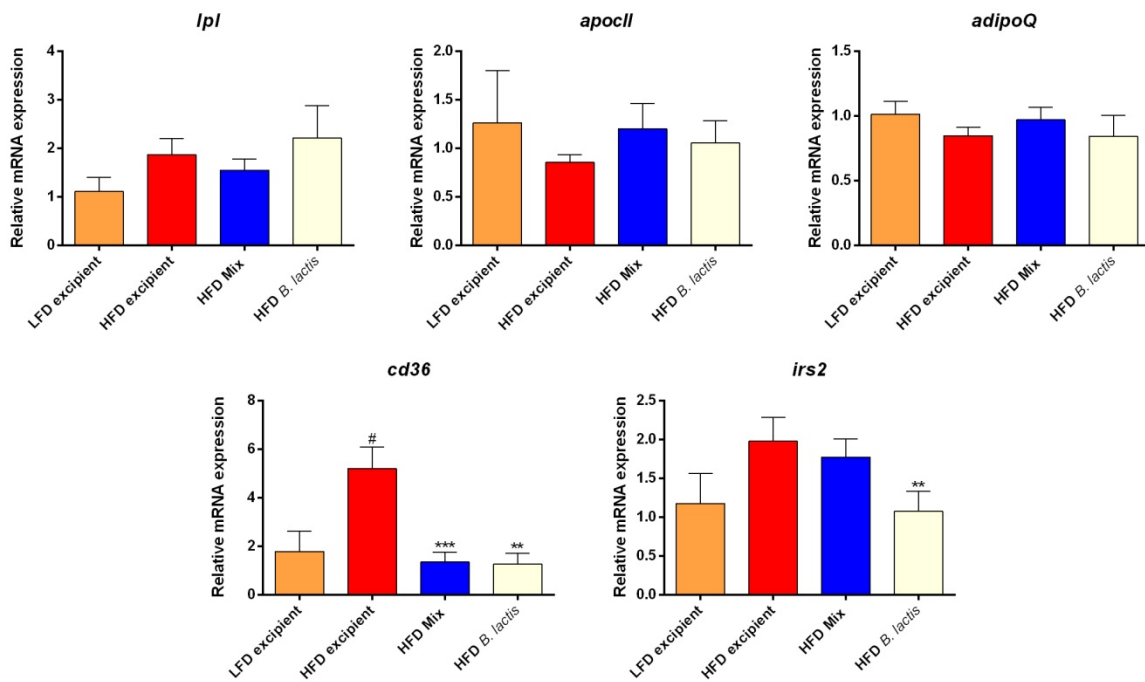


**Figure complémentaire 10 : L'expression du gène codant le récepteur aux acides biliaires TGR5 est augmenté par les probiotiques au niveau du duodénum. \* correspond à l'effet du traitement (probiotiques vs excipient). \*  $p < 0.05$**

Au niveau du tissu adipeux viscéral, une augmentation significative de l'expression des gènes pro-inflammatoires est observée chez les souris sous régime HFD par rapport aux souris minces. L'administration des probiotiques entraîne une diminution significative de l'expression de ces marqueurs inflammatoires et à l'inverse tend à restaurer l'expression de *foxP3* (Fig C11). Le métabolisme lipidique est peu dérégulé chez les souris obèses, seule l'expression du gène *cd36* est significativement augmentée. L'administration des probiotiques est par contre capable de diminuer significativement l'expression de ce gène (Fig C12).



**Figure complémentaire 11 : le recrutement des cellules inflammatoires est diminué dans le tissu adipeux viscéral. # correspond à l'effet du régime (LFD vs HFD), \* correspond à l'effet du traitement (probiotiques vs excipient). \* et #  $p < 0.05$  \*\* et ##  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$**



**Figure complémentaire 12 : le métabolisme des lipides est peu modulé dans le tissu adipeux viscéral, mais les probiotiques sont capables de diminuer l'expression des gènes de régulation lorsqu'ils sont sur-exprimés. # correspond à l'effet du régime (LFD vs HFD), \* correspond à l'effet du traitement (probiotiques vs excipient). #  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$**

Au niveau de l'hypothalamus, l'expression de *pomc*, *npv*, *agrp*, l'hypocrétine, la leptine et son récepteur a été analysée. Aucune modulation de l'expression de ces gènes n'a été observée chez les souris (résultats non montrés).

## **Article 2 : Sélection de souches probiotiques à haut potentiel dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques intestinales par approches *in vitro* et *in vivo*.**

J. Alard, V. Peucelle, D. Boutillier, J. Breton, S. Kuyllé, B. Pot, S. Holowacz, et C. Grangette.

**Probiotic strains with a high potential for inflammatory bowel disease management identified by combining *in vitro* and *in vivo* approaches.**

**En révision dans Beneficial Microbes**

### **Introduction**

Des études récentes ont placé le microbiote au centre de l'équilibre entre la santé et le développement de pathologies. La composition du microbiote est spécifique à l'hôte et évolue tout au long de la vie. Son équilibre est important pour maintenir une bonne homéostasie intestinale et inflammatoire. Les dysbioses du microbiote sont reconnues en tant que facteur de risque dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), notamment dans la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Chez les patients souffrants de MICI, une diminution de la diversité bactérienne est observée, principalement une diminution des *Firmicutes* et en particulier de *Faecalibacterium prausnitzii*, accompagnée d'une diminution de l'abondance de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Les MICI sont également caractérisées par une perturbation de la barrière intestinale, notamment due à l'augmentation de bactéries potentiellement pathogènes au niveau de la muqueuse au détriment des bactéries commensales. Ce déséquilibre exacerbe la perte de tolérance vis-à-vis des bactéries commensales et entraîne une réponse inflammatoire chronique locale. L'utilisation de souris axéniques a conforté le rôle du microbiote, qui est impliqué dans le développement de l'inflammation et l'installation des MICI. Le ciblage de la dysbiose du microbiote est donc une stratégie intéressante dans le traitement des MICI. Ceci peut se réaliser de différentes manières : la transplantation fécale, l'utilisation de prébiotiques ou comme nous l'avons choisi l'utilisation de probiotiques. Au sein de l'équipe, nous avons montré la corrélation entre les capacités anti-inflammatoires *in vitro* des souches et leurs capacités protectrices *in vivo* dans des modèles de colite induite (Foligne et al., 2007b). La sélection des souches repose actuellement sur les capacités immunomodulatrices. Des critères supplémentaires sont nécessaires pour améliorer la sélection de souches plus efficaces. Notre objectif a été de

sélectionner des souches probiotiques ayant des capacités anti-inflammatoires couplées à des capacités de renforcement de la barrière intestinales à l'aide de modèles *in vitro* et d'évaluer leur fonctionnalité *in vivo* à l'aide de modèles de colites aiguë et chronique.

### **Résumé des résultats**

Nous avons dans un premier temps étudié les capacités immunomodulatrices des souches en comparant leur capacité à induire la libération de cytokines après stimulation *in vitro* de cellules mononucléées isolées de sang humain. Les bifidobactéries possèdent le meilleur profil anti-inflammatoire (forte production d'IL-10, faible taux d'IL-12 et d'IFN $\gamma$ ). Les lactobacilles ont une capacité de production de cytokine souche dépendante. Les meilleurs niveaux d'IL-10 ont été obtenus avec les souches *L. salivarius* LA307 et *L. rhamnosus* LA305.

Dans un second temps, nous avons évalué la capacité des souches à restaurer ou renforcer la barrière à l'aide d'un modèle de barrière épithéliale composé d'une monocouche de CaCo-2 polarisée puis sensibilisée avec du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduit bien à une perte de l'intégrité de la barrière. Toutes les souches probiotiques testées sont capables de restaurer la barrière, sauf le *Streptococcus thermophilus* PI21 et le *Lactococcus lactis* PI23. De façon intéressante, certaines souches sont capables non seulement de restaurer la barrière suite à l'action de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais également de renforcer l'état basal de la barrière.

Suite au criblage *in vitro*, nous avons sélectionné cinq souches probiotiques présentant à la fois un profil anti-inflammatoire ainsi que de bonnes capacités de protection de la barrière et la souche possédant la meilleure capacité de renforcement de la barrière, mais aucune activité anti-inflammatoire *in vitro*. Nous les avons testées dans un modèle murin de colite aiguë induite par l'administration d'une dose élevée de TNBS et dans un modèle de colite chronique induite par l'administration de trois doses croissantes sub-cliniques de TNBS. Différents facteurs ont été évalués, tels que la perte de poids, la longueur du côlon, le score macroscopique de Wallace, le taux plasmatique d'IL-6 et le score histologique d'Ameho. La modulation de l'expression de gènes d'inflammation et de jonction serrée a également été suivie dans le tissu colonique. Les six souches sélectionnées ont des capacités protectrices, mais ce ne sont pas les mêmes souches qui protègent significativement lors d'une colite aiguë ou lors d'une colite chronique.

## **Conclusion**

Nous avons sélectionné des souches probiotiques pour leur capacité à restaurer l'équilibre immunitaire et leur capacité de protection de la barrière. La combinaison de deux types de modèles *in vitro* nous a permis de sélectionner des souches présentant des fortes capacités de protection en colite aigüe ou chronique.



## **Article 3 : Stratégie de sélection de souches probiotiques à haut potentiel dans le traitement de l'obésité**

J. Alard, D. Boutillier, V. Peucelle, S. Kuylle, J. Desramaut, B. Cudennec, I. Wolowczuk, B. Pot, S. Holowacz and C. Grangette

**Strategies for the selection of efficient probiotics using *in vitro* screening and *in vivo* murine model of obesity**

**Article en préparation en annexe 1**

### **Introduction**

L'obésité est caractérisée par une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle consécutive à l'augmentation en nombre et à l'hypertrophie des adipocytes. De plus, l'obésité est associée à un état inflammatoire chronique à bas bruit, faisant suite à des changements cellulaires au niveau du tissu adipeux, avec en particulier un recrutement de cellules inflammatoires, notamment de macrophages conduisant à la libération de cytokines pro-inflammatoires. Cet état inflammatoire contribue au développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. L'obésité est également associée à une dysbiose du microbiote, avec notamment une diminution du rapport *Bacteroidetes/Firmicutes* et une diminution de l'abondance des bactéries bénéfiques telles que les bifidobactéries et *Akkermansia muciniphila* et de façon globale une chute des bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte (AGCC), issus de la fermentation bactérienne des fibres alimentaires. Ces AGCC sont connus pour agir sur la prise alimentaire, l'homéostasie du glucose et la fonction barrière de l'épithélium, notamment par l'induction de signaux entéro-endocrines. L'utilisation de probiotiques dans le traitement de l'obésité est donc apparue comme une stratégie potentielle de modulation du microbiote.

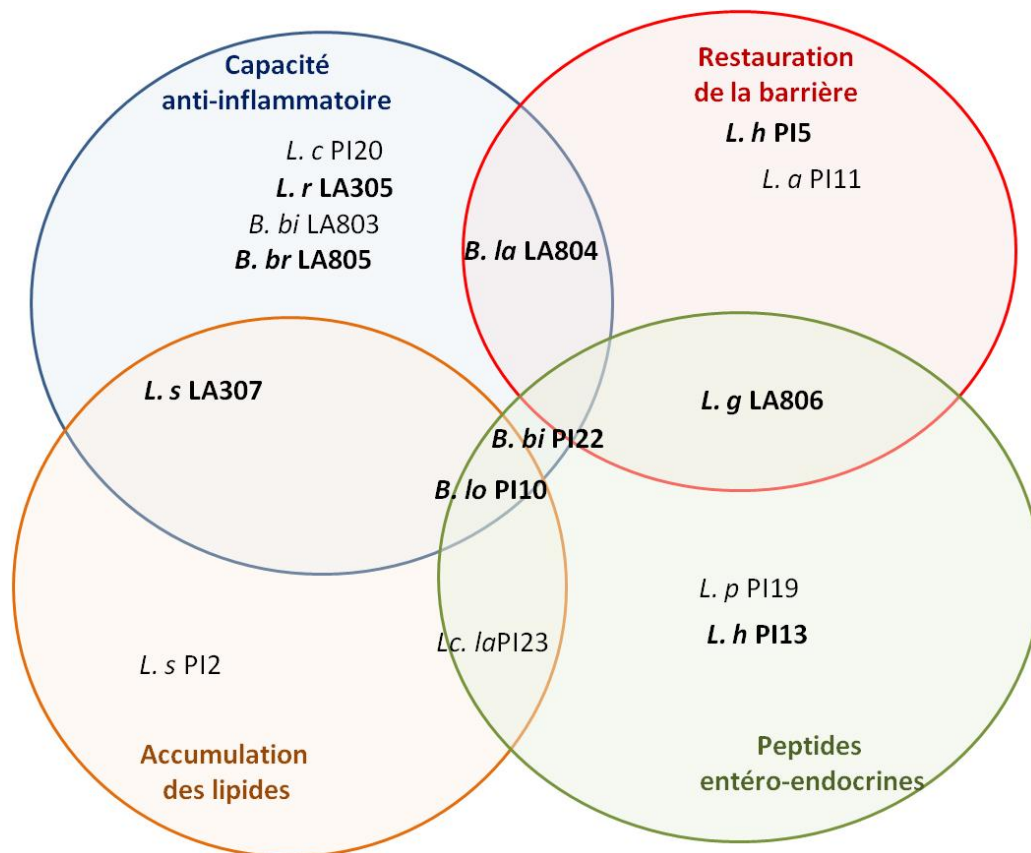
### **Résumé des résultats**

Nous avons, dans un premier temps, évalué *in vitro* les capacités anti-inflammatoires des souches. Les bifides présentent les meilleurs profils de sécrétion d'IL-10 tandis que la production de la cytokine anti-inflammatoire par les lactobacilles est souche spécifique. Nous

avons ensuite évalué la capacité des souches à restaurer la barrière intestinale à l'aide d'un modèle de barrière épithéliale composé d'une monocouche de CaCo-2 polarisée puis sensibilisée par du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduit bien à une perte de l'intégrité de la barrière. Toutes les souches probiotiques testées sont capables de restaurer la barrière, sauf le *Streptococcus thermophilus* PI21 et le *Lactococcus lactis* PI23. De façon intéressante, certaines souches sont capables de renforcer la barrière. Nous avons également évalué la capacité des souches à limiter l'accumulation des lipides *in vitro* à l'aide de la lignée pré-adipocytaire 3T3-L1. Quatorze souches sont capables de limiter l'accumulation des lipides, mais quatre uniquement de manière significative par rapport au contrôle non stimulé. Nous avons ensuite évalué la capacité des souches à induire *in vitro* des peptides entéro-endocrines, notamment le GLP-1, en utilisant la lignée entéro-endocrine murine STC-1. Quatre souches (*L. plantarum* PI19, *B. lactis* LA306, *L. helveticus* PI13 et *L. gasseri* LA806) induisent des taux significativement plus élevés que le contrôle butyrate et deux bifides *B. bifidum* PI22 et *B. longum* PI10 sont capables d'induire des niveaux très élevés de GLP-1 supérieurs aux taux induits par l'acétate.

Nous avons tout d'abord sélectionné 6 souches (Figure 23) présentant les meilleures capacités dans l'un ou plusieurs des modèles *in vitro* : *L. salivarius* LA307, *B. bifidum* PI22, *L. helveticus* PI5, *L. rhamnosus* LA305, *B. breve* LA 805, *B. animalis* subsp. *lactis* LA 804. Ces souches ont tout d'abord été évaluées à l'aide d'un modèle d'obésité induite par un régime à 60% de graisse. Aucun effet probant de ces souches n'a été observé que ce soit sur le gain de poids et l'adiposité ou l'impact sur l'insulino-résistance (*cf* résultats complémentaires de l'article 3-I p209). Nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation d'un régime HFD 60% pouvait être trop drastique pour évaluer les effets potentiels des probiotiques. Nous avons donc poursuivi l'évaluation des souches à l'aide d'un modèle murin d'obésité induit par la consommation d'un régime à 45% de gras. Nous avons à l'aide de ce modèle évalué *in vivo* l'impact la souche *B. longum* PI10 administrée de façon individuelle et de trois mélanges comprenant la souche *B. lactis* LA804 et soit *L. helveticus* PI5, *L. gasseri* LA806 ou *L. helveticus* PI13. L'administration du *B. longum* PI10 et du mélange *L. gasseri* LA806/*B. lactis* LA804 a pu conduire à des capacités protectrices en limitant la prise de poids, l'adiposité viscérale et sous cutanée, alors que les deux autres mélanges n'ont eu aucun effet significatif. L'effet protecteur de *B. longum* PI10 et du mélange a été associé à une diminution des taux plasmatiques de glucose à jeun et de leptine, mais aucun effet sur l'insuline et l'adiponectine, ni sur la résistance à l'insuline lors d'un test de tolérance au glucose. Au

niveau du tissu adipeux viscéral, nous avons suivi l'expression de gènes inflammatoires. Comme précédemment observé, les souris HFD présentent une expression de ces gènes plus forte que les souris LFD. L'administration du *B. longum* PI10 et du mélange *L. gasseri* LA806/*B. lactis* LA804 réduit l'expression de gènes inflammatoires (*tnfa*, *mcp1*) et de marqueurs des macrophages (*cd68*). La diminution de l'expression de gènes inflammatoires, ainsi que de gènes régulateurs du métabolisme lipidique (*fabp1*) est également retrouvée au niveau du jéjunum. De façon intéressante au niveau du duodénum, l'expression du proglucagon est augmentée chez les souris ayant reçu le mélange *L. gasseri* LA806/*B. lactis* LA804, ainsi que l'expression du récepteur couplé aux protéines G des acides biliaires : TGR5. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie glucidique au niveau hypothalamique. De façon intéressante l'administration de *B. longum* PI10 et du mélange *L. gasseri* LA806/*B. lactis* LA804, a été capable d'augmenter l'expression de la leptine et de son récepteur, accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'orexine et plus modérément de POMC, deux hormones ayant un effet anorexigène.



**Figure 23 :** Schéma récapitulatif des souches bénéfiques dans les quatre modèles *in vitro*.

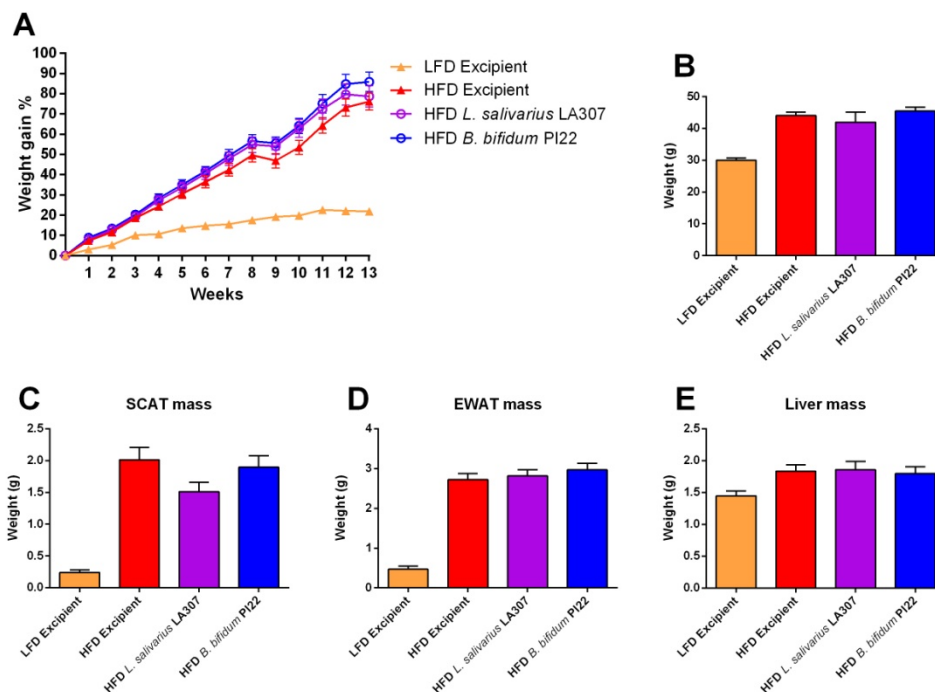
## Conclusion

La combinaison de quatre modèles *in vitro* a permis la sélection de souches ayant des capacités anti-inflammatoires, de restauration de la barrière, de limitation de l'accumulation des lipides et de l'induction de peptides endocrines. Toutes les souches sélectionnées et administrées individuellement n'ont pas été capables de limiter l'obésité, excepté la souche *B. longum* PI10 dans un modèle d'obésité à 45% de gras. L'administration d'un mélange composé des souches *L. gasseri* LA806 et *B. lactis* LA804 a également réduit la prise de poids. Les critères de sélection semblent avoir conduit à des résultats prometteurs mettant en évidence les effets bénéfiques d'une souche et d'un mélange de souches dans le contexte de l'obésité. Les résultats indiquent déjà des mécanismes sous-jacents impliquant un impact sur l'inflammation associée et potentiellement sur la résistance à la leptine. Nos travaux seront poursuivis pour évaluer l'impact des souches sur la composition du microbiote et des AGCC et sur le pool d'acides biliaires.

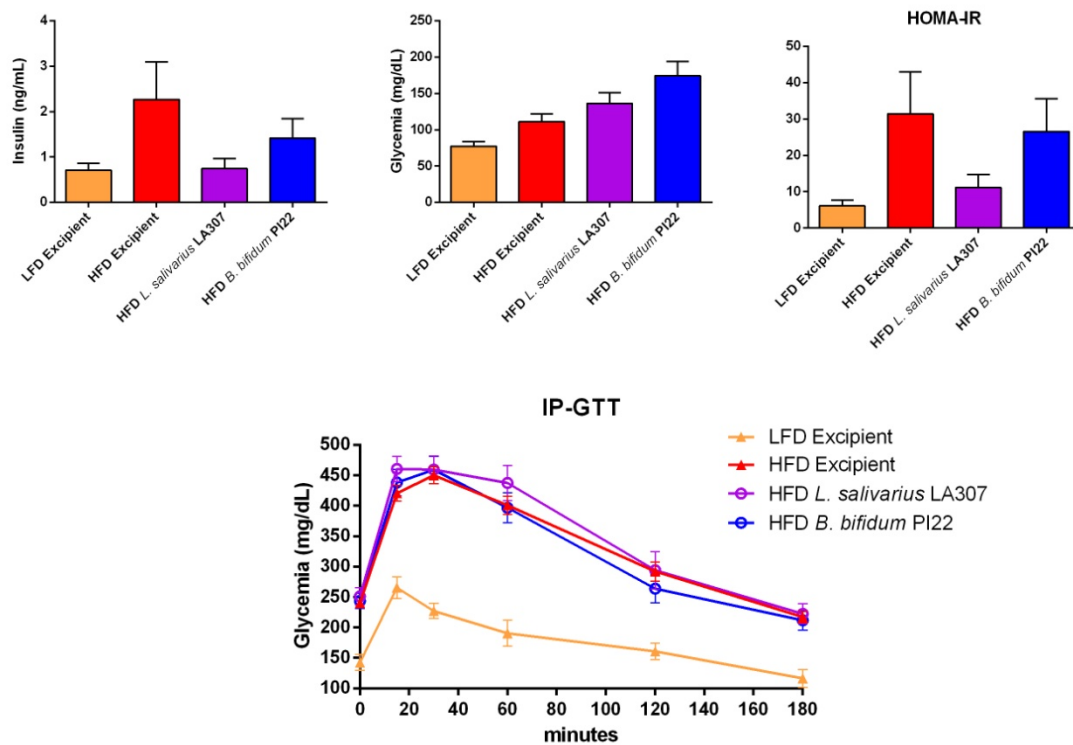
## Travaux complémentaires à l'article 3

### I. Effets de souches sélectionnées pour leurs capacités protectrices *in vitro* dans un modèle d'obésité induite par la consommation d'un régime hyperlipidique à 60% de gras

A l'aide des modèles *in vitro* d'évaluation de la capacité anti-inflammatoire, de la capacité à restaurer la barrière et de la capacité à limiter l'accumulation des lipides au sein des adipocytes, nous avons sélectionné les deux meilleures souches *L. salivarius* LA307 et *B. bifidum* PI22 pour les évaluer *in vivo* dans un modèle d'obésité induite par la consommation d'un régime hyperlipidique à 60% de gras. De façon surprenante l'administration de ces deux souches individuelles, malgré leurs fortes capacités dans les trois modèles n'ont pas été capables de diminuer la prise de poids, ni l'adiposité (Fig C13). L'insulinémie à jeun est diminuée, mais pas la glycémie, les résultats du test de tolérance au glucose indiquent que les souris traitées par les probiotiques sont autant insulino-resistantes que les souris contrôle HFD (Fig C14)

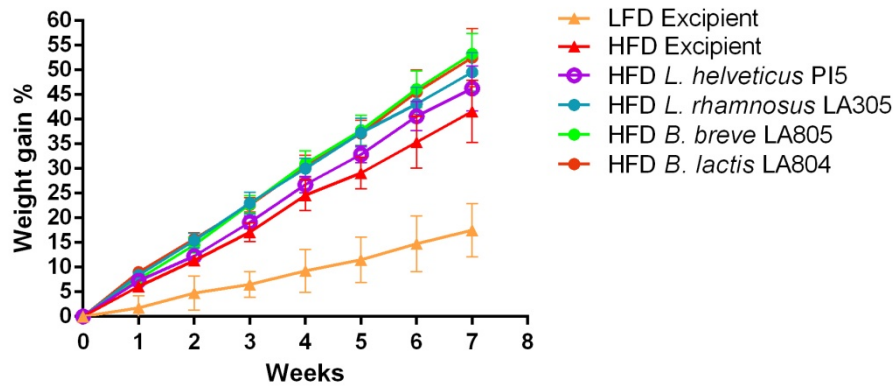


**Figure Complémentaire 13 : Les probiotiques malgré leurs fortes potentialités *in vitro* ne protègent pas contre l'obésité.** (A) Evolution du gain de poids (%) (B) et poids final (g) (C) Poids des tissus sous-cutané et (D) viscéral (E) et du foie (g).



**Figure Complémentaire 14 : Les probiotiques malgré leurs fortes potentialités *in vitro* ne protègent pas contre le développement de l'insulino-résistance.** Insulinémie et glycémie à jeun après 9 semaines de régime. Test de tolérance au glucose (IP-GTT) réalisé après 12 semaines de régime.

Nous avons par la suite mis en œuvre un modèle *in vitro* en collaboration avec Benoit Cudennec, pour évaluer la capacité de nos souches à sécréter du GLP-1 (résultats présentés dans l'article 3). Par la suite nous avons sélectionné quatre souches *L. helveticus* PI5, *L. rhamnosus* LA305, *B. breve* LA805, *B. lactis* LA804 ; chaque souche étant soit la meilleure dans l'un des modèles *in vitro*, soit cumulant trois critères protecteurs *in vitro*, que nous avons également évaluées à l'aide de ce modèle d'obésité induit par un régime à 60% de gras. Nous n'avons observé aucune diminution de la prise de poids après 8 semaines de régime (Fig C15).



**Figure Complémentaire 15 : Suivi de la prise de poids suite à l'administration des souches *L. helveticus* PI5, *L. rhamnosus* LA305, *B. breve* LA805, *B. lactis* LA804 dans un modèle d'obésité induite par la consommation d'un régime à 60% de gras.**

Suite aux résultats précédents, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation d'un régime HFD 60% pouvait être trop drastique pour évaluer les effets potentiels des probiotiques. Nous avons donc par la suite évalué l'effet de la souche *B. longum* PI10 administrée seule et trois mélanges de souches comportant la souche *B. lactis* LA804 et soit *L. helveticus* PI5, *L. gasseri* LA806 ou *L. helveticus* PI13, à l'aide d'un modèle murin d'obésité induit par la consommation d'un régime lipidique à 45%. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article 3.

## II. Comparaison de l'efficacité des mélanges sélectionnés dans les régimes d'obésité à 45% et 60% de gras

Suite aux effets positifs du mélange des souches *B. lactis* LA804 et *L. gasseri* LA806 dans le modèle de régime à 45% de gras (Article 3), nous avons ensuite comparé l'impact de l'administration de ce mélange dans les deux modèles liés soit à un régime à 45% ou à 60% de gras. Dans cette expérience, nous avons également évalué un nouveau mélange composé de la souche *B. longum* PI10 qui présentait seule des effets sur le poids, l'inflammation et l'augmentation des peptides anorexigènes dans l'hypothalamus, associée à la souche *L. helveticus* PI5 possédant *in vitro* les meilleures capacités de restauration de la barrière confirmé *in vivo* dans les modèles de colites (cf Article2).

Nous avons confirmé que le mélange *B. lactis* LA804/*L. gasseri* LA806 diminuait la prise de poids dans le modèle de régime à 45% de gras. Le mélange *B. longum* PI10/*L. helveticus* PI5 diminuait la prise de poids à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine de régime, mais à partir de la 13<sup>ème</sup> semaine, un regain de poids a été observé, rejoignant le poids des souris contrôles soumis au régime HFD 45%. (Figure C16A). De façon surprenante, l'administration des deux mélanges dans le modèle de régime à 60% de gras n'a eu aucun effet significatif sur la prise de poids (Fig C16B).

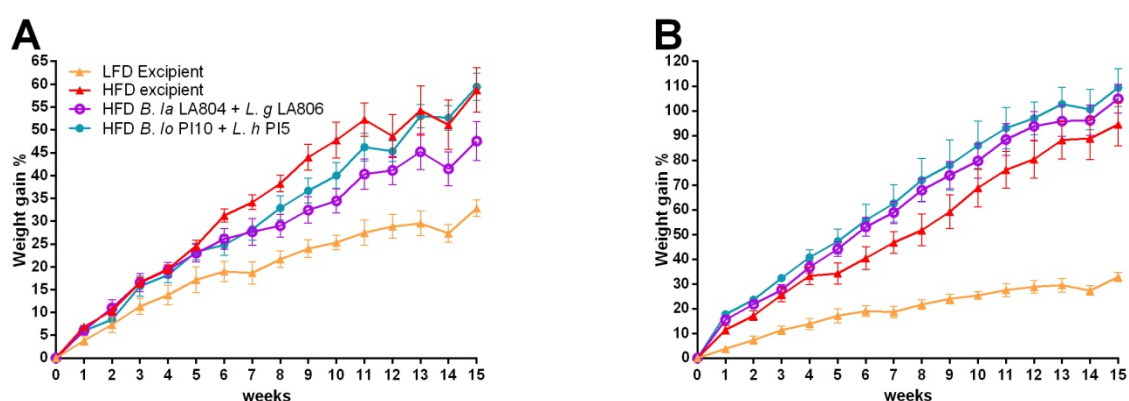
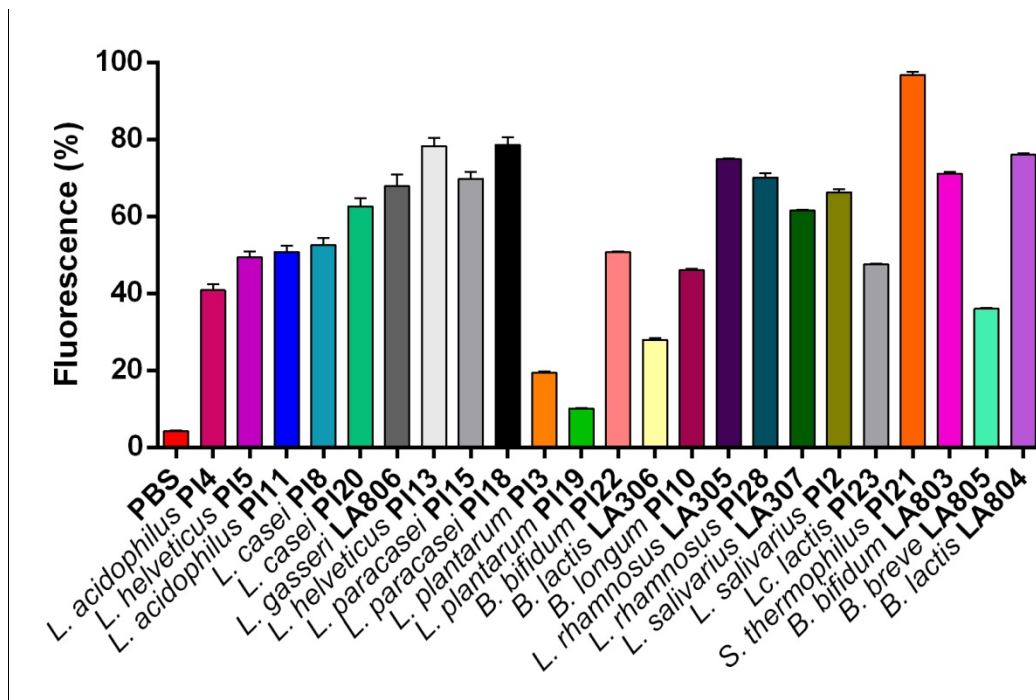


Figure Complémentaire 16 : Comparaison de la limitation de la prise de poids lors de la consommation d'un régime soit à 45% soit à 60% de gras. (A) Suivi de l'évolution du gain de poids dans un régime à 45% de gras (%) (B) Suivi du gain de poids dans un régime à 60% (%).



### III. Effets des souches sur le GLP-1

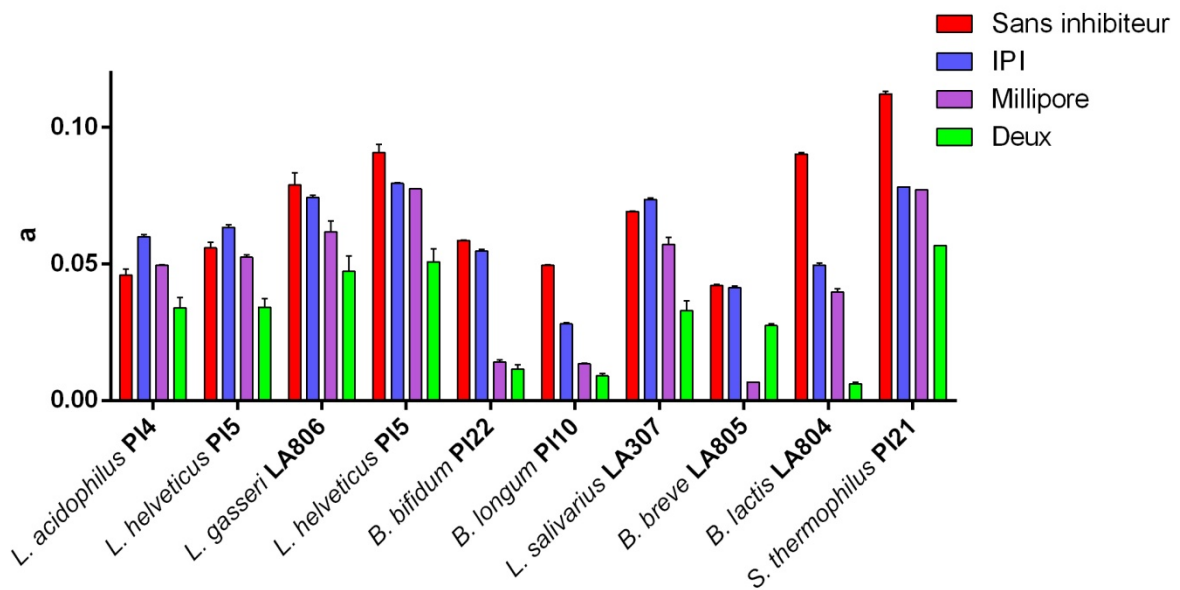
Suite à la collaboration avec Benoit Cudennec et la mise en place du modèle STC-1 au sein du laboratoire, nous avons remarqué que les souches induisaient une sécrétion très variable de GLP-1, après stimulation des cellules STC-1 *in vitro*. Nous avons émis l'hypothèse que les souches étaient peut être capables de dégrader le GLP-1 et avoir une activité DDP-IV-like. Nous avons donc évalué la capacité de nos souches à dégrader le GLP-1. Grâce à l'utilisation du Gly-Pro-AMC qui est un substrat fluorescent de la DDP-IV, nous avons pu suivre, en collaboration avec Benoit Cudennec, l'activité DDP-IV potentielle des souches en suivant le clivage du substrat par l'émission d'une fluorescence. Comme nous l'avions pensé, toutes les souches présentent une activité enzymatique, cependant plus ou moins forte selon les souches (Fig C17).



**Figure Complémentaire 17 : Suivi de l'activité DDP-IV-like des souches probiotiques par l'utilisation d'un substrat fluorescent.**

Nous avons par la suite testé différents inhibiteurs de la DDP-IV uniquement sur les souches que nous avons sélectionnées en expérimentation animale. Ces inhibiteurs sont soit le peptide Ile-Pro-Ile (IPI), soit l'inhibiteur commercialisé par la société Millipore, soit une association des deux à concentrations égales. Nous avons observé différentes courbes enzymatiques d'apparition de la fluorescence. Pour plus de facilités de comparaison, nous avons comparé les pentes des courbes obtenues (représenté par a). Plus « a » est petit, moins il

y a de fluorescence donc moins d'activité enzymatique. La pente de la courbe du PBS est de ce fait proche de 0. De façon assez intéressante, nous n'avons pas réussi à diminuer totalement l'activité enzymatique de nos souches avec l'inhibiteur peptidique et l'inhibiteur commercial, sauf pour trois des souches (*B. bifidum* PI22, *B. longum* PI10 *B. breve* LA804). L'ajout des deux inhibiteurs n'a pas d'action combinée (Fig C18). Ces résultats suggèrent que nos résultats *in vitro* d'induction de GLP-1 par stimulation de la lignée STC-1 sont très certainement sous-estimés.



**Figure Complémentaire 18 : Comparaison de l'activité enzymatique DPP-IV-like des souches en présence de différents inhibiteurs.**

#### **IV. Travaux en cours**

Les travaux concernant l'évaluation de la souche *B. longum* P110 et du mélange *B. lactis* LA804 et *L. gasseri* LA806 (Article 3) se poursuivent par l'étude de la composition du microbiote des souris pour évaluer si ces souches restaurent la dysbiose du microbiote, comme nous l'avons observé avec le mélange *L. rhamnosus* LMG S-28148 et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LMG P-28149 (Article 1), (collaboration avec l'équipe de Emmanuelle Maguin, Unité Micalis, INRA de Jouy-en-Josas). L'analyse de la composition en acides biliaires de nos échantillons sanguins et fécaux (en collaboration avec l'Unité Inserm 1011, Bart Staels, Lille) est en cours et devrait nous permettre d'évaluer si les propriétés protectrices des souches sont corrélées à une modulation du pool des acides biliaires, en lien avec la modulation de l'expression génique du récepteur aux acides biliaires TGR5 que nous avons observée dans le duodénum. Afin d'approfondir les mécanismes d'action, le dosage des acides gras à chaîne courte (AGCC) est également en cours (collaboration avec la société Prodigest, Belgique).

# MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRE

## Test incrétine

La capacité des souches à induire *in vivo* la sécrétion de peptides entéro-endocrines a été évaluée à l'aide d'un modèle murin (n=5 par groupe). Les souches fraîches sont re-suspendues en PBS à une concentration de  $1 \times 10^9$  CFU/souris dans 100 $\mu$ L. Les bactéries et le contrôle PBS sont administrés pendant trois jours. Après un jeûne de 5 heures, de la sitagliptine à 10 mg/kg dans une solution de 0,5 % de CMC (carboxymethylcellulose sodium salt) est administrée aux souris. Après 45 min un bolus de glucose (2g/kg) est administré par voie orale aux souris en présence ou non des bactéries (vol/vol bactéries/ glucose). Le sang de la veine porte est prélevé 15 min après. Les peptides GLP-1, PYY et GIP sont dosés dans le plasma à l'aide d'un kit miliplex (Millipore, Billerica, USA).

## Activité DDP-IV-like des bactéries

Les souches sont cultivées pendant 16h, puis lavées une fois en PBS. Une suspension contenant  $1 \times 10^7$  CFU de chaque souche est mise en contact avec 1 mM de Gly-Pro-7-amido-4-methylcoumarin hydrobromide (Sigma Aldrich, Missouri, USA). L'émission de la fluorescence est lue à 200V pendant 20 min en continu. Les inhibiteurs sont ajoutés à une concentration finale de 2mM.

# DISCUSSION

## I. L'utilisation thérapeutique des probiotiques dans le contexte de l'obésité induite par un régime à 60% ou à 45% de gras

L'obésité est associée à un état inflammatoire chronique à bas bruit, initié dans le tissu adipeux blanc. Ceci contribue au développement de la résistance à l'insuline et au diabète de type 2. Le tissu adipeux est associé à une hypertrophie adipocytaire, à des changements dans la composition des cellules immunitaires et à une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires. L'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux est une caractéristique de l'état pro-inflammatoire de l'obésité chez l'homme et dans les modèles murins d'obésité induite. A l'inverse, le nombre et la fréquence des cellules T régulatrices sont réduits dans le tissu adipeux. L'obésité est également associée à une dysbiose du microbiote, dont la fonction métabolique est altérée.

Nous avons dans un premier temps démontré que les effets protecteurs des probiotiques sont souche-spécifiques, à l'aide d'un modèle d'obésité induite par la consommation d'un régime hyperlipidique (HFD) à 60% de gras. Nous avons testé l'administration de la souche *Lactobacillus salivarius* Ls33, souche anti-inflammatoire de référence (Foligne et al., 2007b), protectrice dans les modèles murins de maladies inflammatoires chroniques intestinales, sur le développement de l'obésité et du développement du syndrome métabolique associé. L'administration de la souche n'a eu aucun effet sur les souris soumises au régime HFD 60%. Ces résultats sont comparables à une étude clinique réalisée sur des adolescents obèses ayant reçu la Ls33 pendant 12 semaines (Gøbel et al., 2012).

En revanche l'administration combinée des souches *Lactobacillus rhamnosus* LMG S-28148 et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LMG P-28149 a réduit le gain de poids, l'adiposité et améliorée la résistance à l'insuline chez les souris soumises au régime HFD 60%. L'administration du mélange a été associée dans le tissu adipeux à une réduction significative de l'inflammation ainsi qu'à un remodelage des cellules immunitaires, notamment une diminution de la quantité de macrophages. Il a été décrit que la population de lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> contrôlent l'inflammation et la sensibilité à l'insuline au sein du tissu adipeux (Feuerer et al., 2009). Nous avons confirmé dans notre modèle une diminution de l'expression de *foxp3* (marqueur des T régulateurs) dans le groupe

de souris HFD, alors que ce niveau est amélioré après administration du mélange probiotique dans le tissu adipeux des souris. Nous avons également montré que l'expression de *ppar $\gamma$*  était plus faible dans le tissu adipeux des souris HFD et que l'administration du mélange de probiotiques restaure significativement son expression. PPAR $\gamma$  a un rôle central dans le recrutement de lymphocytes T régulateurs au sein du tissu adipeux (Cipolletta et al., 2012; Hamaguchi and Sakaguchi, 2012). Il a également montré que les capacités anti-inflammatoires de PPAR $\gamma$  sont impliquées dans la sensibilité à l'insuline (Chen et al., 2012). PPAR $\gamma$  joue également un rôle dans la régulation du glucose et dans le métabolisme des lipides, certains de ses gènes cibles étant *glut4* (transporteur de glucose), *ap2* (régulateur du glucose et du métabolisme lipidique) ou encore *lpl* (rôle dans l'absorption des triglycérides) (Pour revue Choi et al., 2014). Au niveau du foie, l'administration du mélange a modifié positivement la régulation lipidique, en diminuant la stéatose hépatique, ainsi que l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique tels que *fabp1*, *srebp1c* ou encore *apocII*. De même, l'expression de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des lipides (*fabp1*, *apocII*, *cd36*) a été également diminuée au niveau intestinal. L'administration du mélange a de plus restauré l'expression des gènes codant les récepteurs couplés aux protéines G reconnaissant les acides gras à chaîne courte (AGCC) : les GPR41 et GPR43. L'analyse du microbiote a mis en évidence, comme décrit dans la littérature, une diminution du rapport *Bacteroidetes/Firmicutes* chez les souris obèses comparativement aux souris minces (Turnbaugh et al., 2006). L'administration du mélange a restauré partiellement ce rapport et il a également restauré les niveaux de *Rikenellaceae* et diminué l'abondance en *Lactobacillaceae*, augmentée chez les souris obèses. L'analyse du microbiote a également montré l'augmentation de l'abondance d'une bactérie considérée comme un marqueur de l'intestin en bonne santé : *Akkermansia muciniphila*. Cette bactérie est capable de dégrader les mucines, elle est importante dans la restauration et le maintien de la couche de mucus et elle est productrice de propionate (Pour revue Gómez-Gallego et al., 2016). Son abondance est inversement corrélée au gain de poids chez l'homme et elle est associée à un état métabolique plus sain après un régime chez des adultes en surpoids (Dao et al., 2016; Zhang et al., 2013). Nous avons également observé une corrélation inverse entre le taux d'*Akkermansia* et le gain de poids chez les souris et une forte augmentation de l'abondance de cette bactérie par les probiotiques. A l'aide d'un modèle d'intestin artificiel *in vitro* comprenant un microbiote humain (modèle SHIME), nous avons observé que l'introduction du mélange probiotique inversait les profils en AGCC avec une diminution des taux d'acétate au profit de butyrate et

de propionate suggérant donc que les souches peuvent avoir stimulé la croissance de bactéries butyrogènes ou propionogènes telles que *A. muciniphila*.

L'administration du mélange probiotique diminue également les taux systémiques globaux de cholestérol, il peut donc avoir un rôle dans le métabolisme des acides biliaires. Les probiotiques sont déjà décrits pour leur activité BSH (*bile salt hydrolase*) et leur impact positif dans le métabolisme du cholestérol (Pavlović et al., 2012). Le mélange VSL#3 a d'ailleurs été décrit pour avoir des effets bénéfiques de modulation du microbiote *via* l'activation de la synthèse d'acides biliaires en inhibant le récepteur FXR chez les souris (Degirolamo et al., 2014).

Nous avons regardé si les effets du mélange pouvaient être attribués spécifiquement à une des deux souches. Seule la souche *B. lactis* a reproduit les effets du mélange sur la prise de poids et l'inflammation au sein des tissus, ainsi que la restauration de l'abondance de *A. muciniphila*. La souche *L. rhamnosus* n'a eu quant à elle uniquement un effet sur l'inflammation.

Nos résultats suggèrent que le mélange probiotique agit à différents niveaux et montrent que les probiotiques ne peuvent pas être sélectionnés uniquement sur leur capacité anti-inflammatoire dans le cas de l'obésité. Même si le mode d'action reste à approfondir, les probiotiques ont pu exercer leurs effets protecteurs en modifiant la composition du microbiote et la libération d'AGCC, ainsi que le métabolisme lipidique et le remodelage cellulaire du tissu adipeux.

Ne disposant pas de modèles prédictifs efficaces pour la sélection de souches à activité anti-obésité, nous avons par la suite développé différents modèles *in vitro* basés sur certains paramètres déficients dans l'obésité. A l'aide de ces modèles, nous avons évalué une collection de souches probiotiques composée de 15 lactobacilles, 6 bifidobactéries, un lactocoque et un streptocoque. L'obésité étant associée à une inflammation chronique à bas bruit, nous avons sélectionné les souches sur leur capacité à induire de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire. L'obésité étant caractérisée par une accumulation de graisse, nous nous sommes intéressés à la capacité des probiotiques à limiter l'accumulation des lipides dans les adipocytes, pouvant jouer ainsi un rôle sur l'hypertrophie associée à l'obésité. L'inflammation chronique induit une perturbation de la barrière intestinale, pour cela nous avons développé un modèle de barrière intestinale en utilisant une monocouche de cellules épithéliales sensibilisée par du peroxyde d'hydrogène et avons évalué la capacité des souches à restaurer ou renforcer cette barrière. Les voies de régulation entéro-endocrines sont dérégulées dans

l'obésité, nous avons donc ciblé la capacité de nos souches à moduler la sécrétion de ces peptides notamment le GLP-1 *via* l'utilisation de la lignée murine entéro-endocrine STC-1. Ce dernier modèle a été plus difficile à mettre en place de par la forte capacité de nos souches à dégrader le GLP-1.

Nous avons noté dans un premier temps que toutes les bifidobactéries possédaient le meilleur profil anti-inflammatoire (sauf la *B. lactis* LA306) et trois lactobacilles : *L. salivarius* LA307, *L. casei* PI20 et *L. rhamnosus* LA305. Sur le panel de souches testées, quatorze ont montré des capacités à limiter l'accumulation des lipides au sein des adipocytes 3T3-L1, mais uniquement quatre de façon significative : *L. salivarius* LA307, *B. longum* PI10, *L. salivarius* PI2 et *Lc. lactis* PI23. Toutes nos souches ont montré des capacités de restauration de la barrière après sensibilisation au peroxyde d'hydrogène, sauf la souche *S. thermophilus* PI21. Quatre souches ont montré en plus des capacités de renforcement de la barrière : *L. helveticus* PI5, *L. acidophilus* PI11, *B. lactis* LA804 et *L. gasseri* LA806. Enfin sept de nos souches : *L. plantarum* PI19, *B. lactis* LA306, *L. helveticus* PI13, *L. gasseri* LA806, *Lc. lactis* PI23, *B. bifidum* PI22 et *B. longum* PI10 ont été capables d'induire des niveaux significatifs de GLP-1, similaires à l'activation par l'acétate.

La combinaison de ces tests nous a permis de sélectionner dans un premier temps la souche *L. rhamnosus* LA305 pour ses capacités anti-inflammatoires, sa capacité à restaurer la barrière et sa capacité à limiter l'accumulation des lipides et la souche *B. bifidum* PI22 pour ses capacités anti-inflammatoires, sa capacité à restaurer la barrière et sa capacité à induire une forte sécrétion de GLP-1. Nous les avons testées dans un modèle d'obésité induite par la consommation d'un régime à 60% de gras comme lors de nos premiers travaux. Les deux souches n'ont pas été capables de limiter le gain de poids, l'adiposité ni la résistance à l'insuline. Nous avons par la suite sélectionné quatre autres souches : *L. helveticus* PI5, pour ses capacités très élevées de renforcement de la barrière ; *L. rhamnosus* LA305, pour ses capacités anti-inflammatoires ; *B. breve* LA805, pour ses capacités protectrices dans les quatre modèles ; et *B. lactis* LA804, pour ses capacités anti-inflammatoire, de limiter l'accumulation des lipides et à produire du peptide GLP-1. Après huit semaines de régime, l'administration individuelle des souches n'a pas été capable de diminuer la prise de poids. Suite à ces résultats nous avons décidé de coupler les effets des souches observés *in vitro*, dans un modèle d'obésité induit par la consommation d'un régime à 45% de gras, moins drastique. Pour cela nous avons choisi trois mélanges de souches comprenant la souche *B.*



*lactis* LA804 et soit *L. helveticus* PI5 ou *L. gasseri* LA806 ou *L. helveticus* PI13. Nous avons également choisi de tester la souche *B. longum* PI10 seule pour sa très forte capacité à induire la production de GLP-1 *in vitro*. La souche *B. longum* PI10 et le mélange *B. lactis* LA804 et *L. gasseri* LA806 ont permis de limiter la prise de poids et la masse grasse. De façon surprenante, l'administration de la souche *B. longum* PI10 seule a permis de diminuer la glycémie, sans moduler la résistance à l'insuline. Néanmoins l'administration de la souche *B. longum* PI10 et du mélange *B. lactis* LA804 et *L. gasseri* LA806 a entraîné une diminution des taux de leptine circulante. Comme décrit précédemment dans nos travaux, nous avons observé une diminution de l'inflammation dans le tissu adipeux viscéral et dans le tissu intestinal, ainsi qu'une régulation des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. De façon intéressante, nous avons également observé une modulation positive du récepteur aux acides biliaires TGR5 par le mélange *B. lactis* LA804 et *L. gasseri* LA806. L'augmentation de TGR5 est décrite dans la littérature comme augmentant la sécrétion de GLP-1 (Katsuma et al., 2005) et ce récepteur aurait un lien dans la diminution de l'obésité (Sato et al., 2007). Les peptides de satiété ayant pour cible l'hypothalamus, nous nous sommes intéressés à la modulation des neurotransmetteurs impliqués dans la satiété. L'administration de la souche seule et du mélange a été capable de réguler positivement l'expression de peptides anorexigènes : l'hypocrétine, POMC, la leptine et son récepteur. Nous n'avons pas observé de modulation des peptides antagonistes orexigènes (NPY et AgRP). La diminution de la leptine circulante diminue la résistance à cette adipokine au niveau hypothalamique et permet ainsi aux neurones d'être sensibles à la leptine produite par l'arc neural et de limiter la prise alimentaire (*Pour revue* Bouassida et al., 2006; Kelesidis et al., 2010).

Nos travaux ont confirmé les effets souches spécifiques des probiotiques. Sont décrits dans la littérature les effets potentiels des probiotiques seuls ou en mélange chez l'homme et dans des modèles expérimentaux (Eviwie et al., 2017; Nagata et al., 2017; Park and Bae, 2015; Sáez-Lara et al., 2016; Shin et al., 2017). Dans la première phase de notre étude, nous avons mis en évidence que les capacités anti-inflammatoires des souches étaient un critère intéressant pour le processus de sélection, conduisant à une diminution *in vivo* de l'inflammation associée à l'obésité au niveau des tissus métaboliques, cependant insuffisante pour conduire à un effet protecteur contre l'obésité, tel que nous l'avons vu avec la souche *L. rhamnosus* LMG S-28148 capable de diminuer l'inflammation dans les tissus mais pas de conduire à un effet significatif sur le gain de poids. De même, la souche *L. salivarius*, souche très anti-inflammatoire dans des modèles de colite (Foligne et al., 2007b), n'a eu aucun effet

positif sur le développement de l'obésité. Le développement de modèles *in vitro* basés sur d'autres critères ciblant diverses dérégulations observées dans le contexte de l'obésité et des modèles *in vivo* d'obésité induite par la consommation de régimes hyperlipidiques, nous a confirmé que la capacité anti-inflammatoire des souches n'est pas à elle seule suffisante. A l'inverse, la capacité d'induction de GLP-1 semble être corrélée à l'effet protecteur des souches, la souche *B. longum* PI10, forte inductrice de GLP-1 *in vitro*, étant à elle seule capable de limiter l'obésité. De même la souche *B. lactis* LMG P-28149 et le mélange *L. rhamnosus* LMG S-28148/*B. lactis* LMG P-28149, souches ayant un effet anti-obésogène significatif, sont capables *in vitro* d'induire des niveaux très significatifs de la sécrétion de GLP-1 après stimulation de cellules STC-1. Un test préliminaire *in vivo* visant à suivre l'effet incrétine de ces souches a également montré que la co-administration du mélange *L. rhamnosus* LMG S-28148/*B. lactis* LMG P-28149 à des souris avec du glucose induit du GLP-1

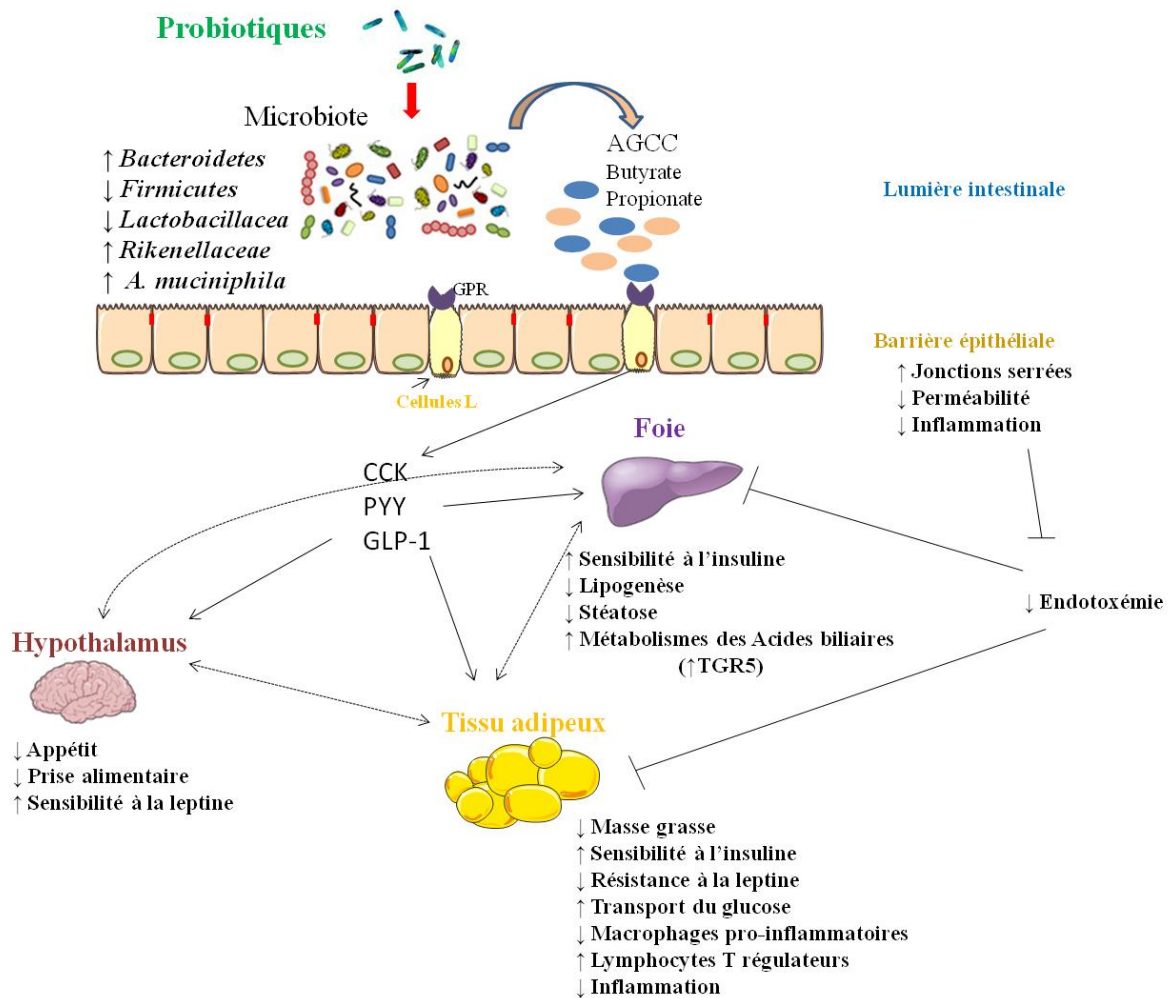
La modulation du microbiote que nous avons observée suite à l'administration *in vivo* du mélange *L. rhamnosus* LMG S-28148/*B. lactis* LMG P-28149 (article 1) -et qui est en cours d'étude pour les autres souches protectrices- pourrait entraîner une modulation de la composition des acides gras à chaîne courte et l'activation de leurs récepteurs (GPR41 et 43). L'activation de ces récepteurs ayant entre autre un rôle dans l'induction des peptides entéro-endocrines, dont GLP-1, est importante pour le contrôle de l'obésité, en favorisant l'homéostasie glucidique et lipidique et en limitant l'inflammation chronique, comme déjà décrit par Lu *et al.* (Lu et al., 2016). D'autres mécanismes semblent être impliqués, comme le métabolisme des acides biliaires. Par exemple, le récepteur aux AB couplé aux protéines G, TGR5, est capable de réguler l'homéostasie métabolique par plusieurs voies et son activation, principalement par les AB secondaires, stimule la sécrétion de GLP-1 par les cellules L (Harach et al., 2012; Katsuma et al., 2005; Kim et al., 2014; Thomas et al., 2009). TGR5 est donc une cible potentielle dans l'amélioration des dérégulations métaboliques. Dans nos deux études, nous avons observé suite à l'administration des souches protectrices une augmentation de l'expression génique du TGR5 ; ceci pourrait être un des mécanismes de protection induit par les probiotiques. Ces effets peuvent être aussi médiés par un effet indirect des probiotiques sur le microbiote, nous avons vu notamment une restauration de la dysbiose, caractérisée entre autre par une restauration d'*Akkermansia muciniphila* et des *Rikenellaceae* dont l'augmentation est associée à un phénotype protecteur dans un modèle d'obésité induite suite à l'administration de la souche *L. salivarius* UCC118 dans l'étude de Clarke (Clarke et

al., 2013). En modulant la composition du microbiote, les probiotiques peuvent non seulement moduler la production des AGCC mais aussi la composition du pool en AB. De façon intéressante, l'abondance de *Lactobacillacea* est augmentée chez des souris obèses, mais l'administration du mélange *L. rhamnosus* LMG S-28148/*B. lactis* LMG P-28149 a été capable de restaurer cette abondance. D'autres études testant les effets de mélange de lactobacilles dans le contexte de l'obésité ont également décrit des effets bénéfiques (Li et al., 2016; Park et al., 2017; Zhang et al., 2016). Nous pouvons suggérer que les *Lactobacillacea* ayant des effets bénéfiques dans l'obésité sont capable de remodeler de façon bénéfique leur propre famille. Les travaux en cours d'analyse du microbiote et de dosage des AGCC et des AB devraient nous donner plus d'information. Il est regrettable de ne pas avoir pu réaliser l'étude de la composition du pool d'AB et des AGCC dans notre première expérience, les échantillons (contenus caecaux) ayant servi à l'analyse du microbiote.

Les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques des souches dans le traitement de l'obésité peuvent être différents selon les souches. Nous avons mis en évidence des souches capables de moduler positivement l'insulino-résistance, comme le mélange *L. rhamnosus* LMG S-28148/*B. lactis* LMG P-28149, sans aucun effet sur la résistance à la leptine. A l'inverse, l'administration de la souche *B. longum* PI10 et du mélange *B. lactis* LA804/*L. gasseri* LA806, tout en diminuant les taux circulants de leptine, a conduit à l'augmentation de l'expression génique au niveau hypothalamique de la leptine et de son récepteur. Ceci suggère que ces souches ont permis une amélioration de la résistance à la leptine, celle-ci étant caractérisée par un défaut de signalisation au niveau hypothalamique malgré des taux de leptine circulante élevée pouvant notamment s'expliquer par un défaut de transport au travers de la barrière hémato-encéphalique (Park and Ahima, 2014). Néanmoins, contrairement aux autres souches, elles n'ont pas permis une amélioration de la résistance à l'insuline. Des gènes impliqués dans la satiété ont cependant été retrouvés sur-exprimés, malgré le fait que nous n'avons pas vu d'effet sur la prise alimentaire dans nos études. Il est donc nécessaire de confirmer ces résultats et d'aller plus loin dans l'analyse des mécanismes d'action des probiotiques bénéfiques dans l'obésité, notamment dans la régulation de l'axe intestin/cerveau.

En conclusion, le renforcement de la barrière ou les capacités anti-inflammatoires ne semblent pas être des critères suffisants à eux seuls pour la sélection de souches protectrices dans le contexte de l'obésité. A l'inverse, la combinaison de deux voir trois critères, ciblés dans nos

différents modèles *in vitro*, visant les capacités anti-inflammatoires, anti-lipidiques et d'induction de GLP-1 semble intéressante. La capacité des souches à induire du GLP-1 semble néanmoins le critère le plus probant. De plus, l'association de deux ou plusieurs souches possédant des capacités positives significatives dans ces trois modèles pourrait représenter une stratégie encore plus précieuse pour une meilleure efficacité dans le contexte de l'obésité.



**Figure 24 : Schéma des différents mécanismes d'action des probiotiques proposés dans le contexte de l'obésité.** Les probiotiques peuvent exercer leurs effets tout d'abord en modulant la composition du microbiote et notamment en favorisant la croissance de bactéries productrices d'AGCC, en particulier le butyrate et le propionate. Ces AGCC peuvent activer des cellules entéro-endocrines présentes au niveau de l'épithélium intestinal *via* certains récepteurs spécifiques et ainsi induire la synthèse de peptides entéro-endocrines. Ces peptides, dont le GLP-1, seront capables d'envoyer des signaux de satiété au niveau du système nerveux central et également moduler l'homéostasie glucique et lipidique. La régulation

métabolique pourra aussi s'effectuer par les capacités anti-inflammatoires des souches capables de bloquer l'état inflammatoire associé à l'obésité et notamment le recrutement de macrophages au sein des tissus métaboliques. Les probiotiques, ainsi que les bactéries du microbiote qui auront pu être modulées, pourront aussi agir sur le pool des acides biliaires qui eux-mêmes *via* des récepteurs spécifiques, tel que TGR5, pourront activer la libération de GLP-1. Toutes ces boucles de régulation pourront permettre le maintien de l'homéostasie glucidique et donc contrôler l'insulino-résistance. Un impact sur la voie de signalisation de la leptine pourra également contrôler la prise alimentaire, la balance énergétique et la sensibilité à l'insuline et ainsi contrôler l'obésité et le développement du diabète de type 2.

## II. L'utilisation thérapeutique des probiotiques dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales

La compréhension des interactions entre le microbiote et le système immunitaire de l'hôte a suscité l'intérêt pour une modulation ciblée des communautés bactériennes de l'intestin en tant que nouvelle thérapie potentielle dans les MICI. L'utilisation des probiotiques dans les MICI est basée à l'heure actuelle sur leur capacité à restaurer la dysbiose du microbiote observée dans ces pathologies. Les MICI sont caractérisées par une inflammation de la muqueuse qui est la conséquence de la perte de la tolérance immunitaire, traduite notamment par un déséquilibre entre les cytokines anti-inflammatoires et pro-Th1. Notre équipe a montré que les souches probiotiques ayant des capacités immunomodulatrices spécifiques *in vitro* possèdent des capacités protectrices *in vivo* dans des modèles murins de colite (Foligne et al., 2007b). Des études chez l'Homme ont montré l'efficacité des probiotiques dans le traitement de la rectocolite hémorragique et de la pouchite (Ghouri et al., 2014; Sáez-Lara et al., 2015). A l'inverse, peu d'effets positifs dans le traitement de la maladie de Crohn n'ont été pour le moment relevés. Les effets observés étant souches dépendants, il est nécessaire d'inclure de nouveaux critères de sélection afin de sélectionner les souches les plus efficaces au niveau thérapeutique.

Les MICI sont associées à une dérégulation de la barrière intestinale, entraînant et maintenant une inflammation chronique au niveau de la muqueuse. Des modèles murins de colite ont mis en évidence la capacité de souches probiotiques à diminuer la perméabilité intestinale (Martín et al., 2016) et des études cliniques ont également montré le potentiel de souches probiotiques dans l'amélioration de la barrière intestinale (Barbara et al., 2012). Les MICI sont caractérisées par des phases aiguës d'inflammation en alternance avec des phases de rémission. Il est donc important d'aborder également la capacité des souches dans les conditions d'inflammation aiguë et chronique.

Nous avons évalué les capacités d'une collection de souches probiotiques à restaurer l'équilibre inflammatoire par l'utilisation *in vitro* de cellules immunes humaines et à restaurer la barrière épithéliale en utilisant un modèle de barrière épithéliale *in vitro*. Tous les bifides ont présenté les meilleures capacités anti-inflammatoires, alors que pour les lactobacilles nous avons observé des effets souche dépendants. Les souches *L. salivarius* LA307 et *L. rhamnosus* LA305 ont été les meilleures inductrices d'IL-10. L'utilisation du modèle *in vitro*

de perméabilité, décrit par Seth (Seth et al., 2008), nous a permis d'observer que seules deux de nos souches n'ont pas été capables de restaurer la perméabilité induite par le peroxyde d'hydrogène ; le *S. thermophilus* PI21 et le *Lc. lactis* PI23. De façon intéressante dans ce modèle, nous avons pu observer que trois souches : *L. acidophilus* PI11, *L. helveticus* PI5 et *L. gasseri* LA806 étaient capable de renforcer la barrière à l'état basal.

Ces deux modèles *in vitro* nous ont permis de sélectionner cinq souches présentant le meilleur profil anti-inflammatoire et les meilleures capacités de restauration de la barrière (*B. bifidum* PI22, *B. lactis* LA804, *B. breve* LA805, *L. salivarius* LA307, *L. rhamnosus* LA305) ainsi qu'une souche présentant le meilleur potentiel de renforcement de la barrière malgré son faible profil anti-inflammatoire (*L. helveticus* PI5). Ces six souches ont été testées dans des modèles murins de colites aiguë et chronique induites par le TNBS. Une plus forte inflammation est observée dans le modèle aigu par rapport au modèle chronique, mimant ainsi respectivement les phases aiguës et de rémission des patients atteints de MICI. La souche *B. bifidum* PI22 possède les capacités de protection les plus fortes contre la colite aiguë, mais elle est peu protectrice dans le modèle chronique. A l'inverse la souche *B. lactis* LA804 présente des capacités significatives de protection en modèle chronique mais qui sont plus faibles en modèle aigu. Par contre la souche *L. salivarius* LA307 a protégé de manière significative dans les deux types de colite. La souche qui présentait les meilleurs résultats *in vitro* de protection de la barrière, *L. helveticus* PI5, a protégé de manière significative les souris dans le modèle de colite aiguë et a augmenté de manière significative l'expression du gène *zo1* codant pour une protéine de jonction, montrant ainsi que la restauration de la barrière intestinale est un bon marqueur pour la sélection de souches dans le contexte d'une inflammation aiguë. Nos travaux suggèrent que ces quatre souches pourraient être combinées dans un mélange au vu de leurs profils anti-inflammatoires et de leurs capacités de restauration de la barrière dans les inflammations aiguë et chronique des MICI.

### III. Conclusion générale et perspectives

L'altération de la composition et/ou diversité du microbiote intestinal semble jouer un rôle important dans le développement de nombreuses pathologies chroniques dont l'obésité et les MICI. Le ciblage du microbiote est donc devenu une alternative importante pour la prise en charge de ces pathologies. Dans ce contexte les probiotiques ont émergé comme une approche intéressante et de nombreux travaux ont rapporté des effets potentiellement bénéfiques en modèles expérimentaux mais qui restent encore très limités au niveau clinique chez l'homme, tout du moins dans le contexte de l'obésité et de la maladie de Crohn. Les effets des probiotiques sont clairement souche-spécifiques et il est donc alors devenu nécessaire de disposer de critères plus scientifiques de sélection pour pouvoir apporter sur le marché des solutions innovantes et efficaces.

Par le développement de divers modèles *in vitro*, nos travaux ont apporté de nouveaux outils de criblage des souches pour une sélection plus optimale dans ces diverses applications. Nous avons également montré que certaines souches peuvent être plus efficaces pour limiter des phases aiguës de la pathologie, notamment dans le contexte des MICI, alors que d'autres seraient plus bénéfiques pour limiter les phases chroniques. Dans le contexte de l'obésité, certaines souches ou mélanges de souches sont capables de limiter la prise de poids, l'adiposité et l'inflammation associée, cependant leurs mécanismes d'action semblent pouvoir être différents, en agissant soit sur l'insulino-résistance ou la résistance à la leptine. Afin d'approfondir ces mécanismes, des travaux sont en cours pour mieux comprendre leur impact sur la modification du microbiote ainsi que sur la composition des acides gras à chaîne courte et des acides biliaires. Il sera néanmoins important d'élargir ces études par des analyses plus poussées à haut débit, telles que des analyses métabolomiques et transcriptomiques pour mieux décrypter la réponse de l'hôte. Enfin, dans le contexte de l'obésité, il serait important d'évaluer l'impact des souches les plus prometteuses dans des modèles de rebond, les regains de poids restant le problème le plus difficile à appréhender chez les patients, résistants à toute intervention nutritionnelle.

Pour conclure, les travaux que nous avons menés en partenariat avec la société PiLèJe, ont permis la sélection de quatre souches potentiellement intéressantes dans le contexte des MICI et de 3 souches dans le contexte de l'obésité. Des mélanges des diverses souches pourraient encore être évalués afin d'améliorer leur efficacité, comme le démontrent de nombreux



travaux mettant en évidence que des combinaisons sont souvent plus efficaces, en particulier des mélanges combinant des lactobacilles et des bifidobactéries.

## TRAVAUX COLLABORATIFS ANNEXES

### **I. Le processus d'atomisation préserve la capacité de protection d'une souche de *Bifidobacterium lactis* isolée de lait maternel contre des colites aigüe et chronique chez la souris**

Burns P, Alard J, Hrdý J, Boutillier D, Páez R, Reinheimer J, Pot B, Vinderola G, Grangette C.

**Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice.**

Sci Rep. 2017 Feb 24;7:43211. doi: 10.1038/srep43211

Un projet collaboratif avec l'Argentine est mené au sein du laboratoire depuis 2013 et a été renforcé par plusieurs séjours d'une jeune chercheur argentine, Patricia Burns, au sein du laboratoire. Son projet a été d'évaluer les capacités protectrices d'une souche argentine de *Bifidobacterium lactis* (souche INL1) isolée de lait maternel dans des modèles de colites aigüe et chronique induites par le TNBS chez la souris et d'en comparer les effets à la souche de référence *B. lactis* BB12, les deux souches étant administrées après culture fraîche ou après atomisation. L'atomisation est un procédé rapide et peu coûteux de séchage de formulations bactériennes mettant en oeuvre une première étape de pulvérisation dans une atmosphère chaude (atomisation) suivie d'une étape de séchage sous pression réduite. Nous avons donc évalué si ces conditions n'avaient pas d'impact sur les capacités immuno-modulatrices des souches et observé que le procédé ne modifiait pas les capacités des souches à induire de l'IL-10 *in vitro*. De la même manière, les deux souches ont protégé les souris des colites, l'efficacité étant similaire après atomisation.

J'ai pris part à différentes étapes de ce projet, notamment en participant aux expérimentations animales, en formant P. Burns aux techniques de qPCR et en réalisant moi-même certaines manipulations pour évaluer l'expression des différents gènes d'inflammation ou de gènes régulateurs chez les souris.

## II. Projet ANR BiopanEx : Un criblage d'immuno-stimulateurs de la cellule de Paneth appliqué à la Maladie de Crohn

Ce projet ANR est un projet collaboratif entre notre équipe (BLIM), l'équipe de Mathias Chamaillard (CIIL, coordinateur du projet), l'équipe de Bernhard Ryffel (CNRS, Orléans) et la société Bioprox. Le projet avait pour but de cribler une collection de souches de la société Bioprox, en ciblant principalement leur capacité à restaurer les fonctions anti-microbiennes des cellules de Paneth, déficientes dans la maladie de Crohn. Ce projet a été principalement mené au sein de l'équipe par un post-doc, Jiri Hrdy. Je l'ai néanmoins formé à de nombreuses techniques, dont la qPCR et la culture de cellules (lignée de cellules de crypte mIC<sub>cl2</sub>) afin de suivre l'activation des gènes codant des peptides anti-microbiens. J'ai eu l'occasion également de participer à quelques expériences complémentaires nécessaires pour la poursuite de ce projet après le départ du post-doc.

J'ai notamment réalisé les qPCR complémentaires sur des échantillons de colon de souris saines ou infectées par *Citrobacter rodentium*, traitées ou non par les probiotiques pour suivre la modulation de gènes impliqués dans le métabolisme enzymatique *AhR*, *CyP1a1* et dans la tolérance immunitaire *ido*. Pour faire le lien entre les expériences réalisées par Jiri et les nouvelles qPCR, j'ai stimulé des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris et des cellules de cryptes mIC<sub>cl2</sub> pendant 2h et 5h, puis suivi l'expression des 3 gènes comparativement à l'expression du gène de ménage  $\beta$ -actine.

Ces travaux ont fait l'objet de communications à des congrès mais la publication concernant ce travail est encore en préparation, les données ne seront pas présentées dans cette thèse.

### **III. Projet Adipofume**

Le projet Adipofume est un projet collaboratif entre notre équipe (BLIM), le groupe de Philippe Gosset et d'Isabelle Wolowczuk (Equipe LI3, CIIL) et l'équipe de David Hot (plateforme de génomique et transcriptomique, CIIL). Le projet a été initié avec le soutien financier de la région des Hauts de France dans le but d'étudier les perturbations immunes et métaboliques (incluant l'étude du microbiote intestinal) associées à la fois à la consommation d'un régime enrichi en graisse et à l'exposition chronique à la fumée de cigarettes. Une modélisation de l'exposition à ces facteurs de risque a été réalisée chez la souris C57BL/6, montrant une exacerbation de l'inflammation pulmonaire ainsi qu'un impact au niveau métabolique lors de l'exposition combinée. Bien que les souris « fumeuses » prennent moins de poids que les souris contrôles lorsqu'elles sont soumises à un régime obésogène, certaines perturbations métaboliques sont observées chez les souris fumeuses, notamment une augmentation de la masse du tissu adipeux viscéral comparativement au tissu adipeux sous-cutané. La cessation de l'exposition à la fumée de cigarettes entraîne, comme observé chez l'homme, une augmentation de la prise de poids, cependant associée à une diminution du statut inflammatoire. Ce projet se poursuit actuellement dans le cadre d'un contrat avec la société PiLeJe, afin d'évaluer l'impact d'un mélange probiotique dans ce contexte.

Ma participation à ces projets a consisté en la réalisation des expériences de qPCR, dans le but d'analyser l'expression de gènes inflammatoires et de gènes codant des protéines de jonctions serrées au niveau des différents segments intestinaux, et à la participation dans certaines analyses histologiques (coupes de tissus adipeux). J'ai également pris le relais lors de plusieurs expérimentations animales, m'occupant de la récupération des tissus intestinaux et du prélèvement de sang à la veine porte. J'ai également assuré le dosage des peptides entéro-endocrines dans le sang portal.

Ces travaux ont fait l'objet de communications à des congrès mais aucune publication n'est pour le moment finalisée, les données ne seront donc pas présentées dans cette thèse.

# ANNEXE 1

## **Strategies for the selection of efficient probiotics using *in vitro* screening and *in vivo* murine model of obesity**

Jeanne Alard<sup>1</sup>, Denise Boutillier<sup>1</sup>, Véronique Peucelle<sup>1</sup>, Sarah Kuyille<sup>2</sup>, Jérémy Desramaut<sup>1</sup>, Benoit Cudennec<sup>3</sup>, Isabelle Wolowczuk<sup>1</sup>, Bruno Pot<sup>1</sup>, Sophie Holowacz<sup>4</sup> and Corinne Grangette<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIIL - Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000 Lille, France ; <sup>2</sup>GENIBIO, Le Pradas, ZI du Couserans, 09190 Lorp-Sentataille, France ; <sup>3</sup>EA 7394, USC 1281 - ICV - Institut Charles Viollette, Univ. Lille, F-59000 Lille, France <sup>4</sup>PiLeJe Laboratoire, 37 Quai de Grenelle, 75015 Paris, France

Correspondence to Corinne Grangette, Lactic Acid Bacteria and Mucosal Immunity, CIIL, Institut Pasteur of Lille, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France; E-mail: Corinne.grangette@ibl.cnrs.fr, Fax: (33) 3 20 87 11 88

## Abstract

The incidence of chronic pathologies, notably obesity and type 2 diabetes has been rising dramatically during the last decades and are important public health problems. Alterations in the gut microbiota composition were suggested to play a role in the development of such chronic diseases, thus targeting this dysbiosis has emerged as novel alternative therapies in the management of obesity. The potential use of probiotics therefore gained attention, although results were sometimes conflicting.

Our project aims to identify and select potent beneficial strains against obesity from a large collection of probiotics (23 strains) using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches. We highlighted the anti-inflammatory potential of probiotic strains using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulation and also the capacity to restore the gut barrier integrity using an *in vitro* gut permeability model with Caco-2 cells. We also evaluated *in vitro* their capacities to limit lipid accumulation in adipocytes differentiated from 3T3-L1 cells and to favor the secretion of gut peptides using the entero-endocrine STC-1 cell line. Seven strains were selected from this *in vitro* screening and were evaluated *in vivo* using a murine model of diet-induced obesity. The *Bifidobacterium longum* PI10 as single strain and the mixture composed of the *B. animalis* subsp. *lactis* LA804 and *Lactobacillus gasseri* LA806 were able to limit weight gain, to reduce fasting glucose and leptin plasmatic levels, and to reduce metabolic dysfunction and associated inflammation. Furthermore, the beneficial effects of selected probiotics on metabolism were associated with hypothalamic modifications of leptin and leptin receptor gene expression.

These studies provided crucial clues in effective selection strategy to identify novel probiotic strains for the development of more efficient therapeutic approaches in the management of obesity, bringing also some insights on their mechanism of action.

## Introduction

Obesity characterized by an excessive body fat accumulation as result of an energy imbalance between intake and expenditure, constitutes a global public health problem worldwide. Visceral adiposity results from increased adipocyte numbers and hypertrophy and is correlated with accumulation of pro-inflammatory macrophages that release inflammatory cytokines. Fat accumulation and cellular depot in adipose tissues contribute to impairment in insulin signaling and sensitivity, key factors in determining metabolic disease risk, notably the development of type 2 diabetes mellitus (T2DM) (Zou and Shao, 2008).

The gut microbiota has emerged as an important factor contributing to the pathogenesis of obesity on the basis that germ-free (GF) mice have reduced adiposity in comparison to conventional mice, a phenotype that can be reversed by colonization with a normal gut microbiota (Turnbaugh *et al.*, 2006). Fecal transplantation from obese donor mice to GF recipients is able to transfer the obese phenotype and similar findings were observed upon transfer of fecal samples from twins discordant for obesity (Ridaura *et al.*, 2013). The microbiota of obese subjects' shows reduced microbial diversity and altered microbial composition, notably beneficial mucosa-associated bacteria such as *Akkermansia muciniphila* are less prevalent in obesity (Alard *et al.*, 2016; Everard *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

The gut microbiota has a great potential to produce or induce bioactive compounds that can affect host metabolism. It has been shown that gut microbiota-derived lipopolysaccharide (LPS) enhanced macrophage recruitment to adipose tissue that lead to the development of insulin resistance (Cani *et al.*, 2007). Conversely, there is increasing evidence to indicate that short chain fatty acids (SCFAs) that derived from bacterial fermentation are key players in the entero-endocrine regulation, inducing the release of gut peptides which influence satiety and improve glucose homeostasis (Lin *et al.*, 2012). SCFA have also been shown to reduce permeability and increase mucus production (Willemsen *et al.*, 2003), thereby enhancing the gut barrier function (Mariadason *et al.*, 1999). Another important class of metabolites, bile acids that are synthesized in the liver from cholesterol and further metabolized by the gut microbiota, can regulate several host processes, including metabolic pathways (Wahlstrom *et al.*, 2016). The limited efficacy of current dietary treatments and the poor success of weight loss maintenance have been shown to be related to a pivotal role of the dysbiotic microbiota linked to its metabolic effects (Thaiss *et al.*, 2016). Therefore, besides lifestyle modifications,

gut microbiota manipulation might represent a novel therapeutic option for addressing obesity. The use of prebiotics has shown potential benefits to restore a healthy gut microbiome and limit obesity (Everard *et al.*, 2011; Neyrinck *et al.*, 2012).

The administration of probiotic bacteria such as specific strains of bifidobacteria or lactobacilli has been also proposed as a potential strategy in the prevention or treatment of obesity (Delzenne *et al.*, 2011). We and others have reported potent beneficial effect in murine models of obesity, showing notably an improvement of both immune and metabolic parameters (Alard *et al.*, 2016; Cano *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2013), including a restoration of the insulin sensitivity. We have also observed that the positive effects were correlated to an impact on the composition of the gut microbiota, notably a restoration of the level of *A. muciniphila* and *Rickenellaceae*. Conversely, we observed an increased abundance of *Lactobacillaceae* in obese mice that was reversed by the administration of a probiotic cocktail containing a *Lactobacillus* strain (Alard *et al.*, 2016). Similar findings were reported in human patients that presented higher fecal *Lactobacillus* abundance correlating with blood glucose levels in T2D patients (Armougom *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2013; Larsen *et al.*, 2010). It is still unknown whether Lactobacilli contribute to T2D or increase in response to the disease, since different *Lactobacillus* probiotic strains have been shown to improve glucose intolerance in mice (Yakovlieva *et al.*, 2015). It is thus remain important to better decipher the potential impact of probiotics. Probiotics may exhibit their beneficial properties by different mechanism including among other, immunomodulation capacities (Foligne *et al.*, 2007a), gut barrier strengthening (Hsieh *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2016), regulation of lipid metabolism and entero-endocrine pathways (Yadav *et al.*, 2013). Accordingly, the aim of the present study was to screen a large collection of 23 strains including 15 lactobacilli from different species for their functional properties using different *in vitro* models targeting their anti-inflammatory potential, their ability to restore the gut barrier function, to induce the release of entero-endocrine peptides and to limit lipid accumulation in adipocytes. Three potent strains were identified and were evaluated in a murine model of obesity either alone or in combination, leading to potent positive effects.



## Materials and Methods

### *Bacterial strains and culture conditions*

Twenty three bacterial strains, including 15 lactobacilli, 6 bifidobacteria, 1 *Streptococcus thermophilus* and 1 *Lactococcus lactis* were provided by PiLeJe Laboratoire and evaluated in this study (Table 1). *L. acidophilus* NCFM strain kindly provided by DuPont™ Danisco (Madison, WI, USA) was also included as a pro-Th1 reference strain (Foligne *et al.*, 2007b). Lactobacilli were grown at 37°C in de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS, Difco, Detroit, USA) and bifidobacteria were cultured at 37°C in anaerobic condition (GENbag anaer, Biomérieux, ville, France), in MRS supplemented with 0.1% (w/v) L-cysteine hydrochloride (Sigma, St-Louis, USA). *L. lactis* and *S. thermophilus* were grown in M17 broth, (Difco, Detroit, USA) supplemented with 0.5% glucose, respectively at 30°C and 42°C. Bacteria were grown overnight, washed twice in sterile phosphate-buffered saline (PBS) buffer (pH 7.2) and resuspended to a final concentration of  $2 \times 10^9$  CFU/ml in PBS for *in vitro* studies. For *in vivo* administration, lyophilized powders (provided by PiLeJe Laboratoire) were resuspended in PBS at  $1 \times 10^9$  CFU/ per mice in 30  $\mu$ l.

### *In vitro stimulation of human PBMCs*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from five healthy informed donors upon approved agreement of volunteers (signed consents) by authorized staff and experimental protocols were approved by our institution committees (INSERM, CNRS and Institut Pasteur de Lille) in accordance with relevant guidelines and regulations as described before (Foligne *et al.*, 2007a). Briefly, after Ficoll gradient centrifugation (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), PBMCs were collected, washed in RPMI-1640 medium (Gibco, Life Technologies, Ghent, Belgium), and adjusted to  $2 \times 10^6$  cells per ml in RPMI supplemented with gentamicin (150  $\mu$ g/ml), glutamine (2 mM), and 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA). Cells were stimulated with PBS or bacteria (bacteria-to-cell ratio of 10:1) for 24 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The supernatants were collected and stored at -20°C until cytokine measurements that were performed using R&D Duoset ELISA kits (R&D, Minneapolis, USA).

### ***In vitro epithelial barrier assay***

Polarized Caco-2 (clone TC7) monolayers were prepared by growing the epithelial cells on 12-well Transwell<sup>®</sup> insert filter (polycarbonate membrane with 3 µm pore size, 12 mm diameters; Costar, Corning Life Science, Kennebunk, USA) at a density of 10<sup>5</sup> cells per cm<sup>2</sup> in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Life technologies, Grand Island, USA) supplemented with 5% heat-inactivated foetal calf serum (Gibco), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, 1% non-essential amino acids and 2 mM glutamine (Gibco) during 14 days in order to reach an optimal trans-epithelial resistance (TEER ≥ 1800 Ω/cm<sup>2</sup>). Cells were treated in the apical compartment, with bacteria (or not) at a bacteria-to-cell ratio of 10:1, 30 min before the addition of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in both apical and basal compartment (at 100 µM final concentration). TEER was measured just before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition (T0) and every 30 min until 120 min. The results were compared to non-treated cells. Three different experiments were performed including duplicates of each condition and results were expressed in % TEER compared to T0 ± SEM.

### ***Cell culture and gut peptides induction***

The intestinal enteroendocrine STC-1 murine cell line was kindly provided by Dr Benoit Cudenec (Institut Charles Viollette, Lille, France). The cells were grown in DMEM (Life technologies), supplemented with 10% foetal calf serum (Dutscher, Brumath, France), 5 mM of L-glutamine and 100 µg/ml streptomycin and penicillin, at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For bacterial stimulation, STC-1 cells were seeded in 24 well plates at 40,000 cells/well and grown for 72h. Cells were washed twice with PBS and resuspended in 400 µl of HEPES 20 mM/ tris 20 mM pH 7.4 buffer containing NaCl 140 mM, KCl 4.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, glucose 10 mM and cells were stimulated with the selected probiotic strains at a MOI 10:1, for 8 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>-95% air atmosphere. The resulting supernatants were centrifuged (8000 g for 10 min) and stored at -20°C. Active Glucagon Like peptide-1 (GLP-1) quantifications were realized by Radio-Immuno Assay (RIA) using EMD Milipore (Billerica, USA)

### ***Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into adipocytes and impact of probiotics on lipid accumulation***

The 3T3-L1 preadipocyte cell line was kindly provided by Dr Sophie Lestavel (Inserm U1011-EGID, Lille, France). The cells were grown in complete DMEM (Life technologies), supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco), 5 mM of L-glutamine and 100 µg/ml streptomycin and penicillin, at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. To differentiate in adipocytes, the cells were seeded in 12 well plates at 3 500 cells/well and grown for 48h using complete DMEM medium and further grown in medium containing 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine and 1 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 48h. Cells were then grown for two days more in complete media containing only 1 µg/ml insulin and were subsequently placed in supplemented DMEM medium for 4 days. After these 10 days differentiation, the cells showed 70–80% cells with lipid droplets observable microscopically. The differentiated cells were treated with the probiotic bacteria at a ratio of 10:1 bacteria to cell for 24h in the presence of gentamycin (3 µg/ml, Gibco) in supplemented DMEM medium.

Intracellular lipid accumulation was measured using Oil-red staining. Cells were washed twice with PBS and stained with 1 ml ready-to-use Oil-red O solution (DiaPath, Martinengo, Italy) for 15 min. Cells were then washed 3 times with PBS and the dye was eluted for 30 min with 100% isopropanol and the absorbance (OD 490 nm) was measured by a spectrophotometer (EL<sub>X</sub>808, Biotech instruments). The percentage of Oil-red-O-stained material relative to control cells without bacteria was calculated as  $A_{490 \text{ nm}} [\text{probiotic sample}] / A_{490 \text{ nm}} [\text{control}] \times 100$ .

### ***Murine model of HFD-induced obesity***

C57BL/6J mice (males of 5-week-old) were purchased from Janvier Laboratories (L'Arbresle, France). Animals were housed in specific pathogen-free condition in the animal facilities of the Institut Pasteur de Lille (accredited no. A59107) and maintained in a temperature-controlled (20 ± 2°C) facility with a strict 12-hour dark/light cycle. Housing and experimentations were performed in compliance with current national and institutional regulations and ethical guidelines (accredited no. 00033.02 from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France). Before experimentation, animals were provided a one week acclimation period and were given *ad libitum* access to

regular mouse chow and water. High-fat and control diets were purchased from Research Diets (Brogaarden, Lyngø, Denmark) (respectively, HFD: 45% kcal fat; D12451, and LFD: 10% kcal fat; D12450B, both irradiated). Detailed diet compositions are listed in Table S1.

Mice received a daily oral administration of  $10^9$  colony-forming units (CFU) of the bacteria resuspended in sterile PBS, five consecutive days per week. For bacterial mixture mice were administered with  $5 \times 10^8$  CFU of each strain. After 1 week, treated mice were randomly assigned to be fed either with LFD diet ( $n = 4$  per group) or HFD diet ( $n = 8$  per group) for additional 14 weeks. Body weight and food intake were weekly recorded. Intraperitoneal glucose tolerance (IP-GTT) test was performed as previously described (Alard *et al.*, 2016) after 12 weeks of diet. Portal vein blood, Sub-cutaneous (SCAT), epididymal (EWAT) adipose tissues, hypothalamus, liver, intestinal segments, caecal contents and fresh feces were collected at sacrifice. Plasma levels of leptin were measured using specific ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, USA).

### ***RNA extraction and gene expression analysis***

Immediately after sacrifice, tissue fragments were put in RNeasy Lysis Buffer (Ambion, Life Technologies, Foster City, CA, USA) and frozen at  $-80$  °C. Tissue samples were homogenized using Lysing Matrix D (MPbio, Eschwege, Germany) and total RNA was extracted using Macherey-Nagel NucleoSpin RNAII isolation kit (Duren, Germany) according to the manufacturer's recommendation. Quantity and quality of RNA were checked by nanodrop (260/280 nm, 260/230 nm); 260/280 ratio was higher than 2 in all samples. RNA (1 µg) was reverse-transcribed using the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems™, Foster City, USA). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using the Power SYBR Green PCR Master Mix on the QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, New Jersey, USA). Primers used in the study are indicated in Table S2. The  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method was used to normalize gene expression.

### ***Statistical analysis***

GraphPad Prism was employed for graph preparation and statistical evaluation. Differences between groups were assessed using ANOVA, followed by nonparametric Mann-Whitney test. Data with  $p$  value  $\leq 0.05$  were considered to be significant.

## Results

### *Strain-specific immunomodulatory capacity of selected probiotics*

The immunomodulatory capacities of the probiotic strains were evaluated by stimulating in vitro human PBMCs and comparing their ability to induce the production of anti-inflammatory (IL-10) or pro-Th1 (IL-12) cytokines. The best strains to exhibit anti-inflammatory profile were mainly bifidobacteria as shown by the highest and significant ( $p < 0.001$ ) IL-10/IL12 ratio (Figure 1). Only *B. lactis* LA306 induced a moderate level of IL-10.

The immunomodulatory capacity of lactobacilli was strain-dependent. The highest IL-10 inducing ability was obtained with *L. salivarius* LA307, *L. casei* PI20 and *L. rhamnosus* LA305.

### *Capacity of the strains to strengthen epithelial barrier*

The ability of the strains to restore and/or strengthen the gut barrier integrity was evaluated using the polarized Caco-2 cell monolayer epithelial barrier model sensitized with  $H_2O_2$  to induce a strong and time-dependent decrease in the transepithelial resistance (TEER), reflecting an increase in epithelial permeability (Table 2). The pre-incubation of the monolayer with the probiotic bacteria led to a restoration of the integrity of the barrier in a strain-dependent manner. All strains were able to decrease the  $H_2O_2$ -induced drop of the TEER, except *Lc. Lactis* PI23 and *S. thermophilus* PI21. Some strains, notably *L. helveticus* PI5, *L. acidophilus* PI11, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LA 804 and *L. gasseri* LA806 were able to restore and even reinforce the epithelial barrier, the TEER being higher than that of non-treated cells.

### *Capacity of the strains to limit lipid accumulation in adipocytes*

The impact of probiotics on lipid accumulation in mature adipocytes was performed using differentiated 3T3-L1 murine cells and red-oil staining. As shown in Figure 2, 14 probiotic strains were able to decrease intracellular lipid accumulation in treated-adipocytes, as revealed by Oil-red-O-staining. However, this effect was statistically significant for only 4 strains (*L. salivarius* LA 307, *B. longum* PI10, *L. salivarius* PI2 and *Lc lactis* PI23) ( $p < 0.05$ )

or 0.01) in comparison to untreated cells. In contrast, 7 probiotic strains led to increased lipid accumulation, yet not significantly.

### ***Capacity of the strains to induce the secretion of GLP-1***

To evaluate the ability of the strains to stimulate gut peptide secretion, we used the murine cell line, STC-1, known to display a phenotype of intestinal endocrine L-cells able to secrete GLP-1 (Rindi et al., 1990). Probiotic strains were able to induce the release of GLP-1 in a strain-dependent manner, and this induction was significant for 7 strains out of 23 (*L. plantarum* PI19, *B. lactis* LA306, *L. helveticus* PI13, *L. gasseri* LA806, *Lc lactis* PI23, *B. bifidum* PI22, *B. longum* PI10), at a level that was higher than the one induced with butyrate and at a similar level to that obtained with acetate (Figure 3). *B. longum* PI10 and *B. bifidum* PI22 were the most potent GLP-1 inducers ( $p < 0.01$ ).

### ***Selected probiotics limited high-fat diet-induced weight gain and adiposity***

We first evaluated the impact of the administration of each of the seven strains that showed the highest in vitro capacities (*L. salivarius* LA307, *B. bifidum* PI22, *L. helveticus* PI5, *L. rhamnosus* LA305, *B. breve* LA 805, *B. animalis* subsp. *longum* PI10 and *B. animalis* subsp. *lactis* LA 804) in a murine model of HFD-induced obesity. None of the strain administrated alone was able to limit the development of obesity, except the *B. animalis* subsp. *longum* (*B. longum*) PI10 strain which was the highest inducer of GLP-1, one of the best IL-10 inducer, and which was also able to decrease significantly lipid accumulation in adipocytes (data not shown).

We further conducted another experiment to confirm the effect of the *B. longum* PI10 strain alone. We also evaluated the impact of the *B. animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) LA 804 which was the highest inducer of IL-10 and which also exhibited a good ability to restore the epithelial barrier and to induce the release of GLP-1 in combination with different lactobacilli: either the *L. helveticus* PI5 which was the best strain to strengthen the epithelial barrier, the *L. gasseri* LA 806 which exhibit good capacity to restore the gut barrier and to induce GLP-1 or with the *L. helveticus* PI13 strain which was a good inducer of GLP-1.

As expected, mice fed with HFD diet gained more weight significantly, in comparison to LFD-fed mice (Figure 4A, 4B) and showed significant increase of epididymal and

subcutaneous adipose tissue masses (EWAT and SCAT, Figure 4D and 4E). The administration of the *B. longum* PI10 alone or the combination of *B. lactis* LA 804 and *L. gasseri* LA806 led to significant protective effects, with strong decrease of the weight gain (Figure 4A and 4B) and of EWAT but also a more limited impact on the SCAT mass. The other mixtures were not protective in these conditions. Food intake was slightly but significantly increased in HFD animals but was not impacted by probiotic consumption (Figure 4C).

In line with the impact on weight gain, the treatment with *B. longum* PI10 alone or the combination of *B. lactis* LA 804 and *L. gasseri* LA806 decreased fasting glucose and leptin levels in comparison with HFD-fed mice that showed a strong increase of these parameters (Figure 5A and 5B). No significant differences were observed in the insulin and adiponectin levels among the different groups (data not shown). To evaluate the impact of probiotics in the development of insulin resistance, we performed a glucose tolerance test after 12 weeks of diet. As expected, HFD-fed mice were significantly less tolerant to glucose, as shown by a strong increase of the glycemia during IP-GTT (Figure 5C). However, no significant differences were observed in probiotic-treated mice.

### ***Selected probiotics dampened the inflammatory status associated with obesity***

To better understand the mechanisms of action involved in the beneficial effect of the protective probiotics, we determined the inflammatory status of the visceral adipose tissue (Figure 6). As expected and previously observed (Alard et al., 2016), HFD-fed mice showed a strong and significant ( $p < 0.01$ ) enhanced expression of inflammatory genes (*Tnfa*, *Mcp1*), notably a significant increase ( $p < 0.05$  or  $0.01$ ) of macrophages specific markers (respectively CD68, CD36). The expression of all these markers was significantly ( $p < 0.05$  or  $0.01$ ) down-regulated when mice received the *B. longum* PI10 alone or the combination of *B. lactis* LA 804 and *L. gasseri* LA806 (Mixture). This was also corroborated at the intestinal level. Mice that were treated with the selected probiotics exhibited a significant decrease of the gene expression of *Mcp1* in the jejunum (Figure 7A).

Interestingly, as previously observed, the expression of the gene encoding FABP1 that facilitate fatty acid (FA) binding was also significantly downregulated in the jejunum of probiotic-treated mice (Figure 7B) and the expression of CD36 was only decreased in the mice that received the mixture (Figure 7C). The mixture also led to a significant increase of

the mRNA expression of proglucagon in the duodenum (Figure 7D), however we did not observed any changes in the portal levels of gut peptides (GLP-1, PYY, data not shown). The expression of the G-protein-coupled receptor of bile acids TGR5 was also significantly increased in the duodenum of the Mixture-treated group (Figure 7E).

### ***Selected probiotics impact on central regulation of energy balance***

We observed in the hypothalamus, a strong and significant increased gene expression of both leptin and leptin receptor in mice that received either the *B. longum* PI10 alone or the mixture (Figure 8A and 8B). This was correlated with a significant increase of the expression of the *hcr* gene (Figure 8C), encoding hypocretin (or orexin) known to increase insulin sensitivity and limit weight gain (Funato et al., 2009) and a moderate increase of *pomc* (Figure 8D), the gene encoding the precursor proopiomelanocortin involved in anorexigenic signal transmission (Millington, 2007). No significant changes in *agrp* (encoding agouti related protein AgRP) or *nyp* (encoding the neuropeptide Y) gene expression were observed (data not shown).



## Discussion

The persistence of an altered microbiome following cycles of obesity and dieting has been shown to contribute to enhanced metabolic deregulation upon weight regain (Thaiss *et al.*, 2016), suggesting a rationale to target microbiota dysbiosis in the management of obesity. We and others have reported that selected probiotics containing single or multiple strains can limit body weight gain in different rodent models of obesity (Alard *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2013), while other studies reported little effect of probiotics or a weight gain (Million *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2010). Even if selected probiotics provided beneficial impacts in patients with obesity, mainly affecting the body mass index and fat mass (for review see Saez-Lara *et al.*, 2016), the widespread use of probiotics in clinical trials against obesity and diabetes remains scarce with limited samples sizes and absence of follow-up studies to clearly demonstrate the long term impact of such treatment (Berstad A, 2016). Moreover, the main probiotic strains that have shown beneficial effects on obesity and T2D in humans belong to the *Lactobacillus* genus (Andreasen *et al.*, 2010; Ogawa *et al.*, 2014). However, *Lactobacillus* species have been shown to be increased both in obese and diabetic patients, even if such increase could be an indirect compensatory response. Moreover, the anti-obesity effect of probiotics is certainly strain or dose-dependent and mechanisms involved remain largely unknown. It thus remains important to better decipher this strain-specificity and design new tools and criteria for the selection of efficient strains.

In this study, we targeted dysfunction associated with obesity to screen a large collection of probiotic strains including 15 lactobacilli and 6 bifidobacteria of different species. Obesity is primary characterized by an increase in body fat mass and lipid accumulation and associated with low grade inflammation that initiates insulin resistance (Cani *et al.*, 2007). Change in the gut microbiota has been shown to impact on gut permeability that leads to metabolic endotoxemia and therefore to contributes to obesity-associated inflammation (Cani *et al.*, 2009). Gut microbiota fermentation end-products, notably short chain fatty acids (SCFA) have also been shown to act as signaling molecules able to induce the release of gut peptides by enteroendocrine cells, such as GLP-1 and PYY known to be not only involved in satiety but also to control gut barrier function, glucose and energy homeostasis and as such insulin sensitivity (De Vadder *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2009). We therefore evaluated *in vitro* i) the anti-inflammatory capacities of the probiotics and ii) their ability to improve the epithelial gut barrier integrity, iii) to limit lipid accumulation in mature adipocytes and iv) to

favor the secretion of gut peptides. We highlighted that bifidobacteria were the main strains to exhibit the best anti-inflammatory profile (except the *B. lactis* LA 306) while 3 lactobacilli displayed a moderate but significant anti-inflammatory properties (*L. salivarius* LA307, *L. casei* PI20 and *L. rhamnosus* LA305). Four probiotics (*L. helveticus* PI5, *L. acidophilus* PI11, *B. lactis* LA 804 and *L. gasseri* LA806) were able not only to restore but also to strengthen the epithelial barrier using a polarized Caco-2 monolayer sensitized with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The intracellular lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte decreased upon stimulation with 14 out of 25 probiotic strains, but only 4 strains (*L. salivarius* LA 307, *B. longum* PI10, *L. salivarius* PI2 and *Lc lactis* PI23) led to a significant impact, signifying that these strains might favour lipolysis. Finally seven strains (*L. plantarum* PI19, *B. lactis* LA306, *L. helveticus* PI13, *L. gasseri* LA806, *Lc lactis* PI23, *B. bifidum* PI22, *B. longum* PI10) were able to induce significant level of the gut peptide GLP-1 upon *in vitro* stimulation of the STC-1 cell line, the two last being the strongest inducers.

The combination of these *in vitro* screening allowed us to select 7 strains that exhibited the best efficacy in one or two models (*L. salivarius* LA307, *B. bifidum* PI22, *L. helveticus* PI5, *L. rhamnosus* LA305, *B. breve* LA 805, *B. animalis* subsp. *longum* PI10 and *B. animalis* subsp. *lactis* LA 804) and to evaluate their capacity to limit the development of obesity in a murine model of HFD-induced obesity. None of the strain exhibited a protective effect when administrated as single strain, except the *B. animalis* subsp. *longum* (*B. longum*) PI10 strain. Interestingly, this strain was the highest inducer of GLP-1, one of the best inducer of IL-10 and was also able to decrease significantly lipid accumulation in adipocytes. However, this bacterium had a moderate impact on epithelial permeability. Since combining bifidobacteria and lactobacilli could also represent an interesting strategy (Holowacz *et al.*, 2015), we also evaluated the impact of 3 mixtures combining the *B. lactis* LA 804 strain which was the best to induce the anti-inflammatory cytokine IL-10 and which also exhibited a good ability to restore the epithelial barrier and to induce the release of GLP-1 with different lactobacilli that either exhibit good ability to strengthen the epithelial barrier (*L. helveticus* PI5, *L. gasseri* LA 806) or to induce the release of GLP-1 (*L. helveticus* PI13, *L. gasseri* LA 806). As shown in Figure 4, we confirmed the positive impact of the *B. longum* PI10 alone and also highlighted the beneficial effect of the combination of *B. lactis* LA804 and *L. gasseri* LA 806 in limiting body weight gain and adiposity, in particular the epididymal adipose tissue mass. These treatments also improved fasting glycemia and blood leptin levels; however in our experimental conditions we did not observe any improvement of the HFD-induced glucose

intolerant state. The consumption of these probiotics also ameliorated the inflammatory status of the mice, since a significant decrease of inflammatory markers, in particular those corresponding to macrophages, was observed in visceral adipose tissues and in jejunums of probiotic-treated mice in comparison to HFD-fed mice. The beneficial effects of these treatments were also associated with a significant decrease of the fatty acid binding protein FABP1 gene expression in the jejunum, involved in the binding, transport and metabolism of long-chain FA, which was up-regulated in obese mice. As lipid chaperones, FABPs may actively facilitate the transport of lipids to cellular specific compartments, such as to the lipid droplet for storage. They are closely linked to both metabolic and inflammatory processes. Mice with *FABP*-deficiency in the gut have been reported to gain more weight and therapeutic targeting of FABP have been suggested as novel strategies in the management of metabolic diseases (Furuhashi and Hotamisligil, 2008).

Interestingly, the protection was also correlated with an increase of the proglucagon (*gcg*) and the Bile Acid Receptor TGR5 (Takeda G protein couple receptor 5) gene expression in the duodenum. The gastro-intestinal tract is now recognized as the largest endocrine organ of the body, able to produced various hormones and neuropeptides involved in food intake, energy expenditure and glucose homeostasis. Notably the classical role of proglucagon which is produced partly in the intestine by L-cells, is to maintain glucose homeostasis, but also to regulate food intake and energy metabolism. Proglucagon is the precursor of both GLP-1 and GLP-2. As incretin, GLP-1 facilitates the insulin secretion in a glucose-dependent-manner and is also involved in the control of food intake and is now an important target for the treatment of obesity. The main role of GLP-2 is to regulate the gut mucosal integrity (Cani *et al.*, 2009) and also to control gastric emptying. The abundance of these two gut peptides has been shown to increase upon prebiotic treatment and related to enhanced glucagon expression (Everard *et al.*, 2011). Bile acids have recently emerged as important signaling molecules, notably through their interaction with specific receptors, in particular the Farnesoid X Receptor (FXR) and TGR5. TGR5 signaling is also involved in the release of GLP-1 and as such in insulin sensibility (Habib *et al.*, 2013). TGR5 has received much attention as a promising target for the development of therapeutic intervention in metabolic diseases including obesity and T2D (van Nierop *et al.*, 2016). The gut microbiota provides unique influence on the diversity of bile acid pool, notably through deconjugation and dihydroxylation having therefore significant consequences for the host that can favor health or disease (Long *et al.*, 2017). Bile salt hydrolase (BSH) is one of the main microbial enzymes that contribute to bile acid

metabolism by generating secondary bile acids (Joyce *et al.*, 2014). Interestingly, BSH activity is specific to the microbiota and has been mainly characterized in *Lactobacillus* (Bateup *et al.*, 1995) but also in *Bifidobacterium* (Kim *et al.*, 2004). We thus can speculate that the strains we studied could exhibit a good BSH activity that can impact on the bile acid pool composition, the gut microbiota composition and as such TGR5 activity and GLP-1 production. Since, no safe TGR5 agonists are available, changes in bile acid pool composition through the manipulation of the gut microbiota could represent an interesting alternative. It is important to note that the strain that exhibited the best protective effect alone (*B. longum* PI10) is the strongest inducer of GLP-1 *in vitro* using the murine STC-1 endocrine cell line. Also, the *L. gasseri* LA 806 that was included in the protective mixture was a good inducer of GLP-1. Unfortunately, we were not able to measure any changes in the portal level of GLP-1 in our *in vivo* experimental conditions. Since the action of GLP-1 is glucose-dependent, we could speculate that we were not in the best conditions to measure its level, since we did not administrated a glucose bolus before sacrificing the mice. Moreover, it is well known that this molecule is rapidly degraded by the dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). Even if we added inhibitors in the samples, we can also speculate that GLP-1 was inactivated. Moreover, preliminary data indicated that most of the strains we tested exhibited a DPP4-like activity that could be responsible for the degradation of the molecule (see complementary data), at least in our *in vitro* model, since *in vivo*, we can hope that the basal secretion of GLP-1 could not be degraded through DPP-4 activities in the gut lumen.

Recent advances have reported the interaction between microbiota and gut-brain axis, influencing neural, endocrine and immune functions (Foster and McVey Neufeld, 2013). Leptin plays an important role in regulating energy, glucose and lipid homeostasis, neuroendocrine and immune functions. Circulating leptin levels are directly in proportion to the amount of body fat, and as such obese individuals exhibit higher levels of leptin in adipose tissue and elevated circulating leptin levels. Indeed we observed an increase in leptin levels in HFD-fed mice together with an increase of fasting glycemia and both were significantly reduced with the probiotic administration. Leptin exerts its effects through binding to specific leptin receptors located throughout the central nervous system (CNS), mostly in the hypothalamus. The high leptin levels observed in obese individuals fail to reduce excess adiposity, indicating leptin resistance (Park and Ahima, 2015). Disruption of leptin signaling in hypothalamic neuronal circuits and other CNS neurons may include impaired leptin transport across blood-brain barrier and hypothalamic inflammation (Jung and Kim, 2013).

Interestingly, we also correlated the protective effect of the selected probiotics to an increase in the gene expression of leptin, leptin receptor and hypocretin (known also as orexin) in the hypothalamus. Leptin by inhibiting the hypothalamic– pituitary–adrenal (HPA) axis can act as a modulator of the hypocretin neuronal activity that plays a role in satiety and energy intake (van Swieten *et al.*, 2014). This signaling promotes obesity resistance via enhanced spontaneous physical activity and energy expenditure regulation and control feeding behavior. Proopiomelanocortin neurons are also direct targets for leptin in the hypothalamus and expression of the *Pomc* gene in the central nervous system results in the production of melanocortin peptides, which appear to play a significant role in appetite and body weight regulation. Interestingly, the expression of *Pompc* was also reduced in probiotic-treated mice, even if this was not significant.

In the whole, the multiple criteria *in vitro* strategy we used was successful to identify at least one very potent strain, the *B. longum* PI10, able to significantly impact on obesity as single strain and a mixture composed of a *B. lactis* and a *L. gasseri* strain. These probiotic treatments may act through different mechanisms, involving notably a decrease in the inflammation status, an improvement of circulating fasting glycemia and leptin level while a positive impact on leptin resistance and activation of neuronal signals important to control insulin sensitivity and energy expenditure. We also identified other potential mechanism involving bile acids pool modification and TGR5 activation. The impact on GLP-1 induction could be one of the central mechanism, since the *B. longum* PI10 and the *L. gasseri* included in the mixture were the most potent to induce GLP-1 *in vitro*, however, it remains important to better decipher *in vivo* this mechanism in the future. We are currently evaluating the impact of the two probiotic preparations on the gut microbiota, bile acids and SCFA composition.

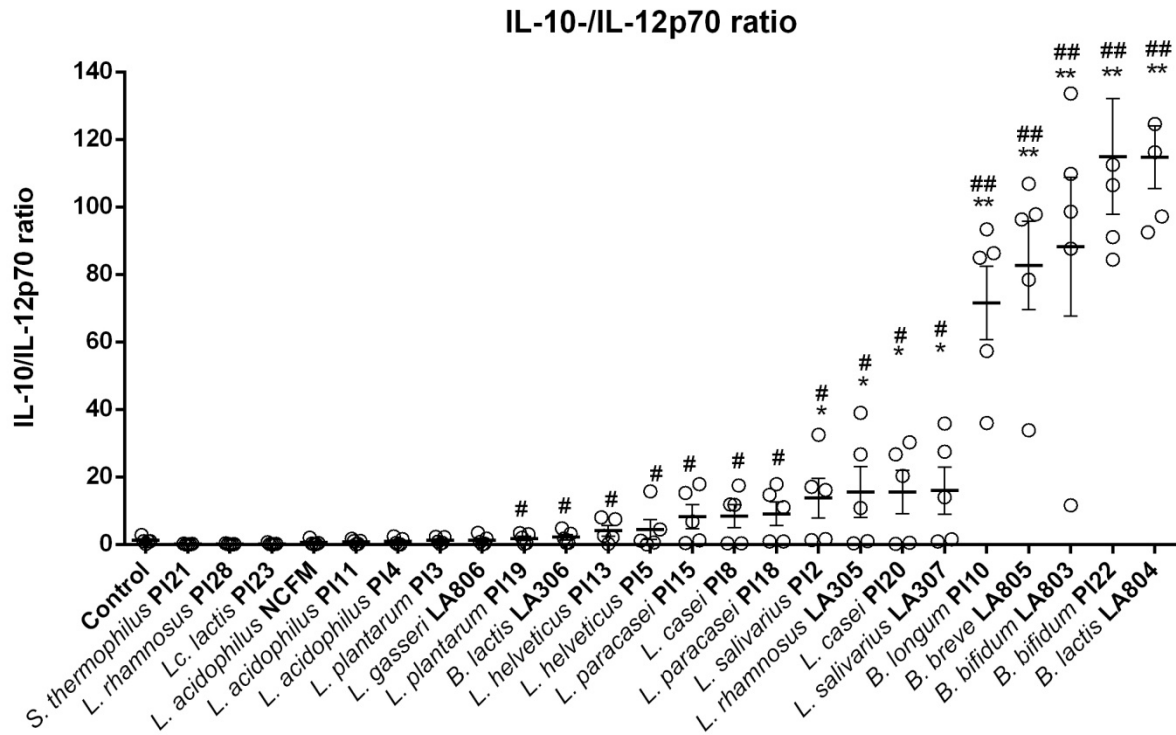
**Table 1: List of bacterial strains used in this study and their origins**

Strains designation	Bacterial species	Origin
LA306	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Human
LA803	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Human
LA804	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Human
LA805	<i>Bifidobacterium breve</i>	Human
PI10	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>longum</i>	Dairy product
PI22	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Human
LA305	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Human
LA307	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Animal
LA806	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Human
PI2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Unknown
PI3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Vegetable
PI4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Human
PI5	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Dairy product
PI8	<i>Lactobacillus casei</i>	Dairy product
PI11	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Human
PI13	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Dairy product
PI15	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Human
PI18	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Human
PI19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Dairy product
PI20	<i>Lactobacillus casei</i>	Human
PI28	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Human
PI21	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Dairy product
PI23	<i>Lactococcus lactis</i>	Unknown

**Table 2: Capacity of probiotics to restore H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced epithelial barrier dysfunction in polarized Caco-2 monolayers**

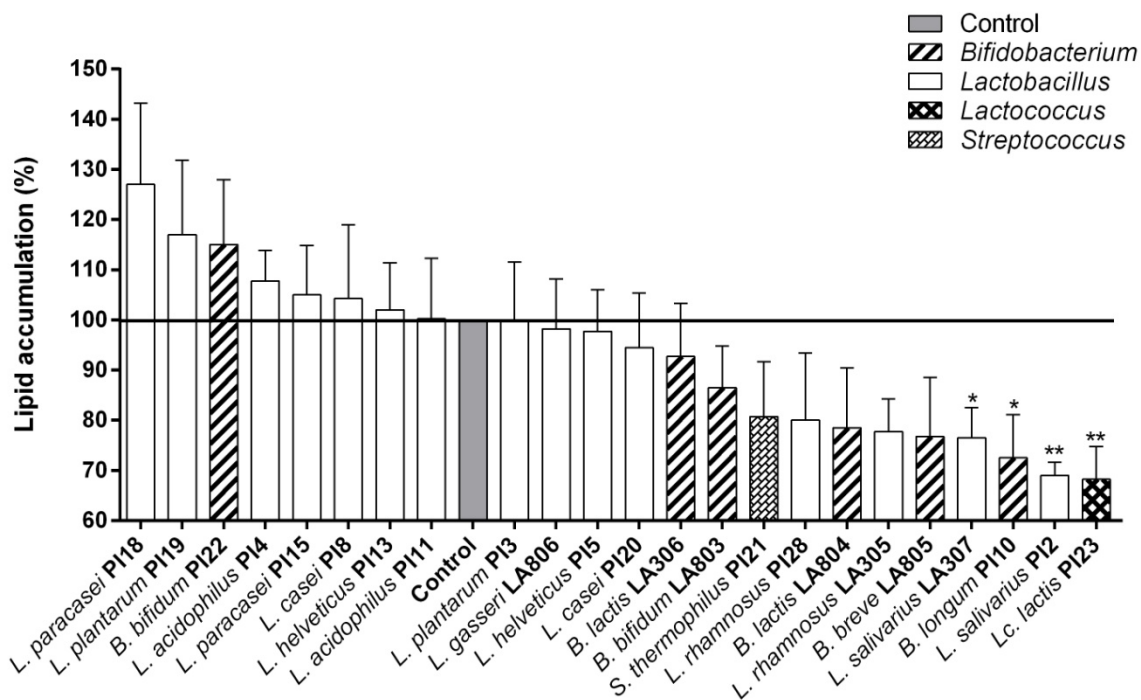
Times (min)	0	30	60	90	120
<i>L. g</i> LA806	100±0	108.44±5.05	102.67±21.99**	102.67±13.30**	104.92±18.27***
<i>L. a</i> PI11	100±0	118.12±11.58**	118.37±10.67***	103.59±11.58**	104.65±16.46***
Control	100±0	102.91±1.87	102.17±1.37	99.37±2.10**	101.97±1.36
<i>L. h</i> PI5	100±0	110.10±3.12**	121.30±10.31***	98.11±8.62**	100.29±13.72***
<i>L. pa</i> PI18	100±0	103.33±3.37*	105.89±7.25***	91.11±7.88**	93.50±10.08***
<i>B. la</i> LA804	100±0	101.81±4.03	123.58±27.77***	95.67±5.85**	93.06±11.74**
<i>B. bi</i> PI22	100±0	108.06±4.55**	107.84±9.74***	97.87±9.30**	90.12±9.28**
<i>L. a</i> PI4	100±0	92.93±11.31	106.89±18.71*	85.04±12.13*	86.35±12.47**
<i>L. s</i> LA307	100±0	95.86±3.26	88.54±5.39	87.93±7.83*	85.34±15.45**
<i>L. c</i> PI8	100±0	109.80±6.71**	110.69±12.26***	80.68±6.77*	81.65±6.00*
<i>L. h</i> PI13	100±0	100.57±3.11	99.49±9.05*	91.40±14.52*	81.40±11.69*
<i>L. pa</i> PI15	100±0	95.80±4.87	94.91±7.27	88.75±11.53*	79.74±10.81*
<i>B. bi</i> LA803	100±0	96.41±3.09	106.03±16.03**	95.29±14.95**	76.89±5.75*
<i>L. c</i> PI20	100±0	98.25±4.19	102.77±10.53**	89.51±9.95*	74.92±8.27*
<i>L. pl</i> PI19	100±0	98.81±4.81	90.23±11.52	79.61±10.60	74.47±8.55*
<i>L. pl</i> PI3	100±0	93.71±6.80	86.32±7.08	78.95±5.82	73.73±6.34*
<i>B. br</i> LA805	100±0	100.71±5.21	97.15±5.55*	92.50±12.72**	73.62±5.89*
<i>B. lo</i> PI10	100±0	96.34±1.87	92.41±5.08	93.13±9.11**	72.75±8.45*
<i>L. r</i> PI28	100±0	99.38±3.69	88.88±7.70	80.02±10.30*	71.62±12.19*
<i>L. s</i> PI2	100±0	99.38±2.37	88.88±6.60	80.02±10.28*	71.62±11.96*
<i>L. r</i> LA305	100±0	96.91±3.93	95.97±6.50*	85.89±9.66*	70.78±10.84
<i>B. la</i> LA306	100±0	89.85±5.63	90.97±11.15	81.33±8.28	70.02±7.41
<i>S. th</i> PI21	100±0	95.90±4.60	89.15±6.13	79.76±6.11	67.91±6.88
<i>Lc. l</i> PI23	100±0	80.77±9.72	87.16±18.52	75.26±16.02	63.33±12.02
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100±0	84.58±3.80#	78.72±6.04##	69.64±6.66###	60.27±8.18###

Results are expressed in % TEER compared to T0 and represent the mean ± SEM of six independent experiments including duplicates of each condition. \* and # refer to the comparisons of probiotic-treated cells versus cells sensitized with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone or to untreated cells, respectively; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01, \*\*\* or #### p < 0.001.

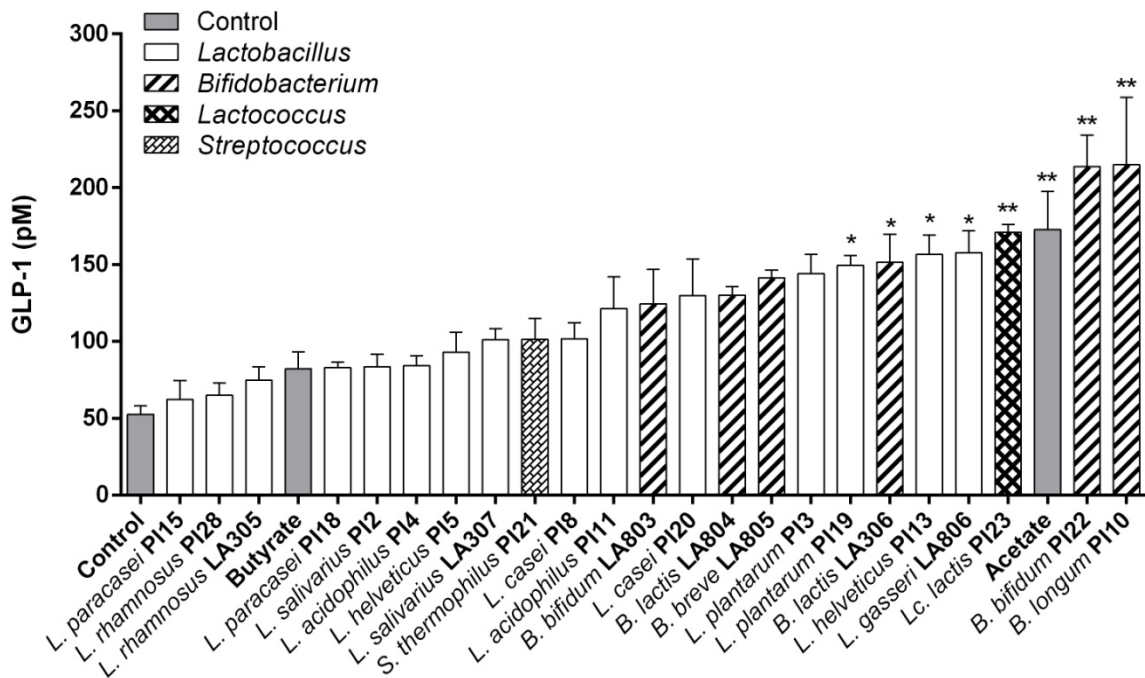


**Figure 1. Immunomodulatory abilities of the tested probiotics.** Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated *in vitro* with lyophilized probiotic strains or with freshly cultured *L. acidophilus* strain NCFM (as a positive control for Th1 cytokines induction), at a ratio of 10:1 (bacteria/cells) for 24 h. Control PBMCs were only treated with PBS. Levels of IL-10, IL-12 and IFN $\gamma$  were measured by ELISA in the supernatant after 24 h stimulation. IL-10/IL-12 ratios were then calculated. Results represent mean  $\pm$  SEM of five independent experiments. \* and # refer to the comparisons of probiotic-stimulated PBMCs versus untreated cells (\* medium control) or *L. acidophilus*-stimulated PBMC (# *L. acidophilus* effect), respectively; \* or #,  $p < 0.05$ ; \*\* or #,  $p < 0.01$ .

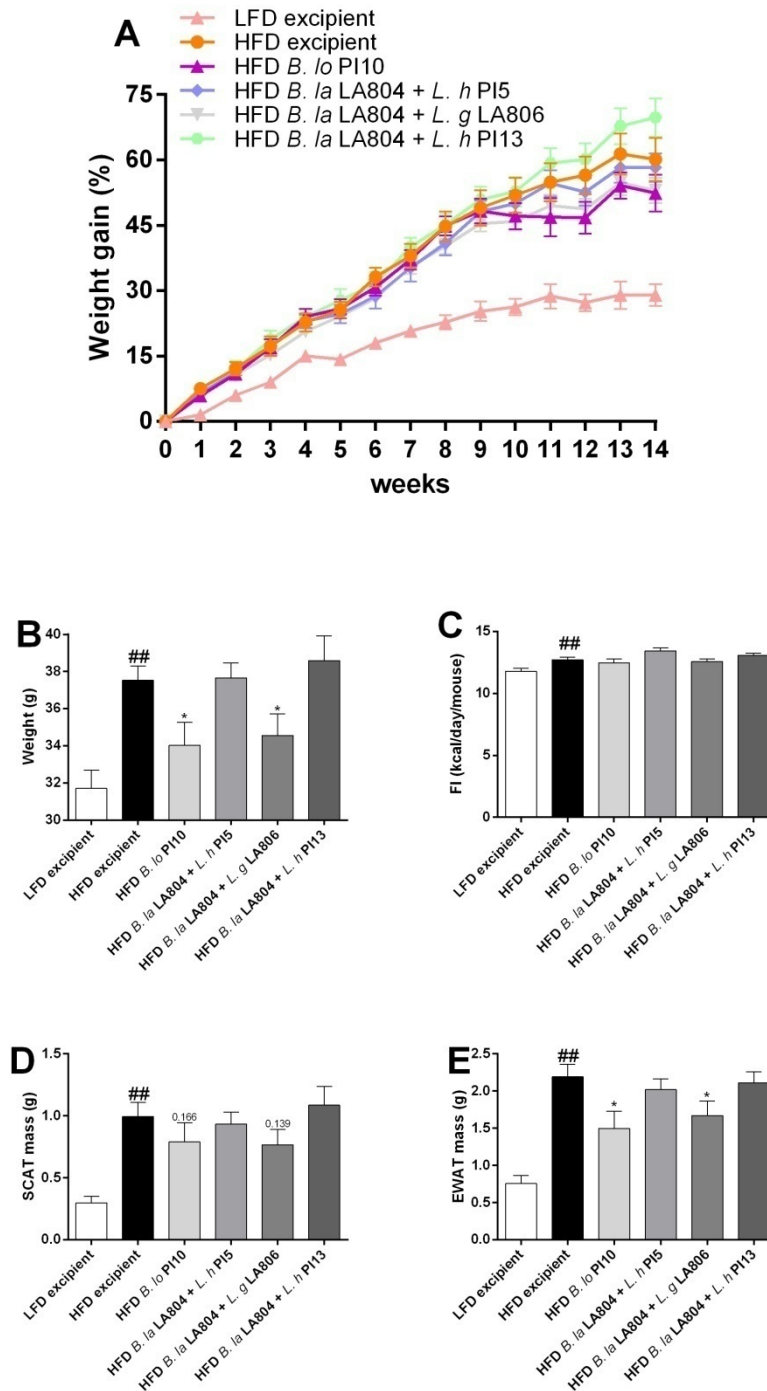




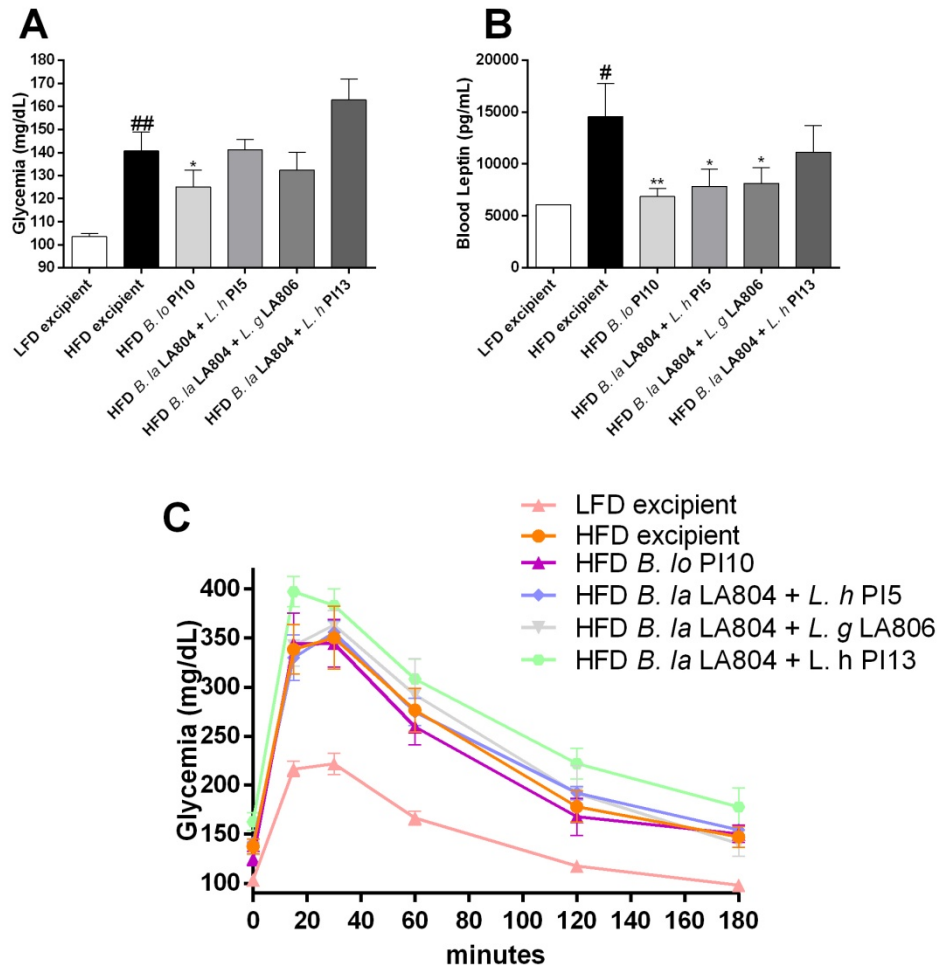
**Figure 2. Effect of probiotic strains on lipid accumulation.** Cells were stained with Oil-red-O to label lipids, the dye was eluted from the cells with isopropanol and quantified, and the results were plotted. \* refer to the comparison of probiotic-stimulated 3T3-L1 versus untreated cells (medium control); \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



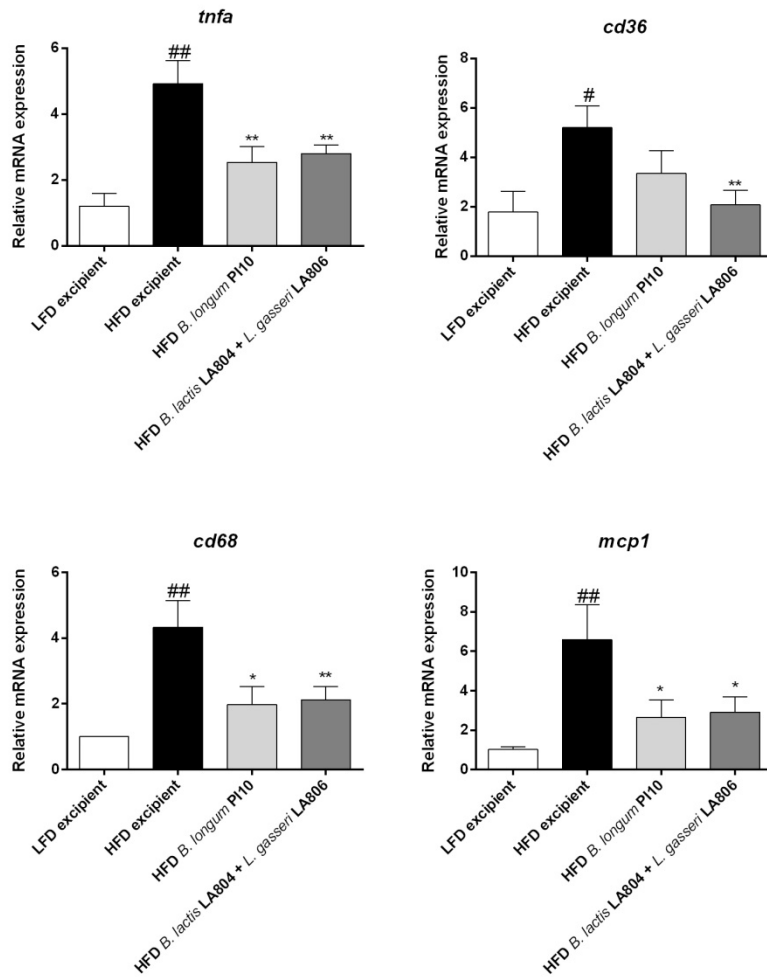
**Figure 3. Induction of GLP-1 secretion upon STC-1 cells stimulation by the probiotic strains.** STC-1 cells were stimulated 8 h with probiotics. GLP-1 secretion was measured by RIA. \* refer to the comparison of probiotic-stimulated STC-1 versus untreated cells (medium control); \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



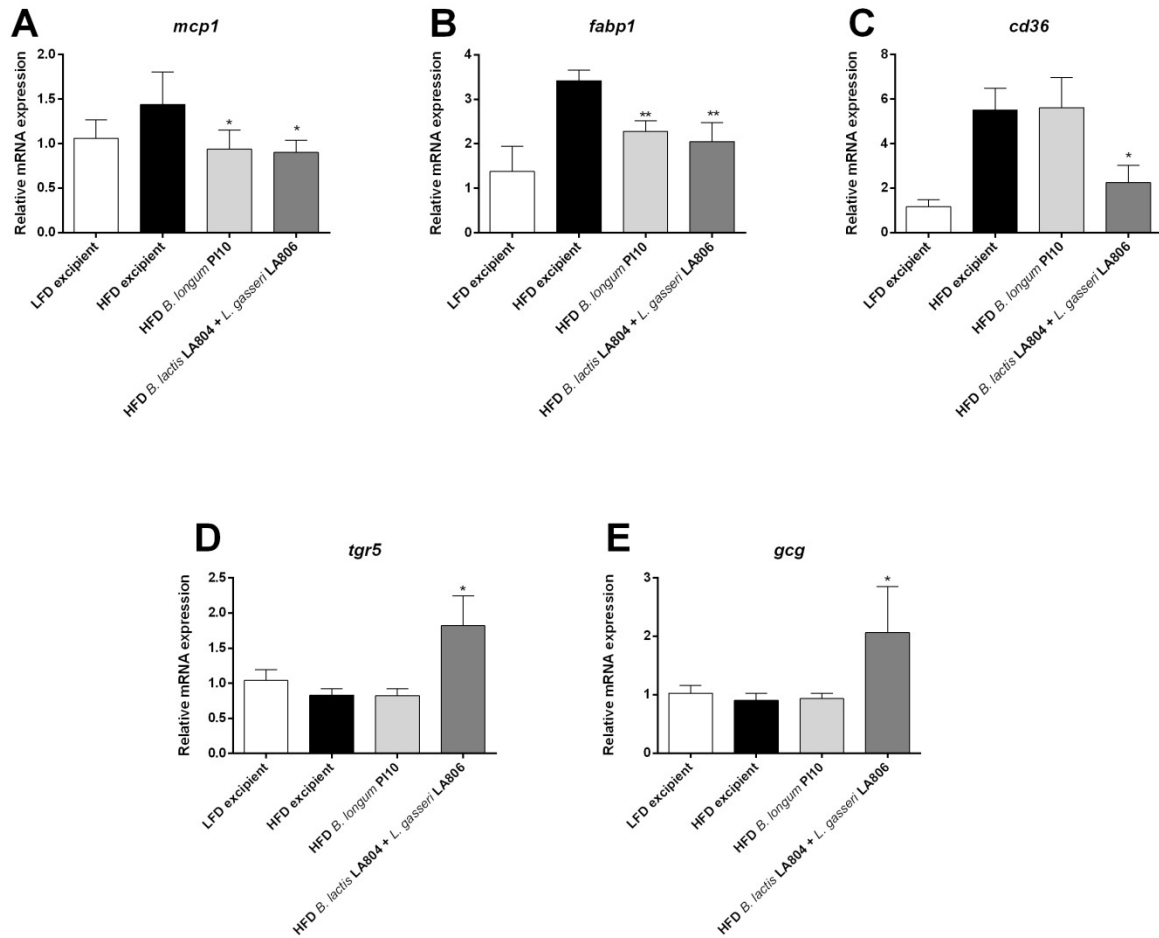
**Figure 4. The probiotic *B. longum* P110 and the mixture *B. lactis* LA804 / *L. gasseri* LA806 limited body weight gain and fat mass increase. (A) Evolution of the body weight gain (in %) of mice receiving the probiotics or excipient and fed a LFD or HFD for 14 weeks. (B) Final weight (in g) (C) Cumulative food intake (kcal/day/mouse). (D) Subcutaneous adipose tissue (SCAT) mass (in g) (E) Epididymal adipose tissue (EWAT) mass (in g). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 4 to 8 mice per group. \* corresponds to regime effect (HFD vs LFD), # corresponds to treatment effect (Probiotic vs Excipient) \*  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ .**



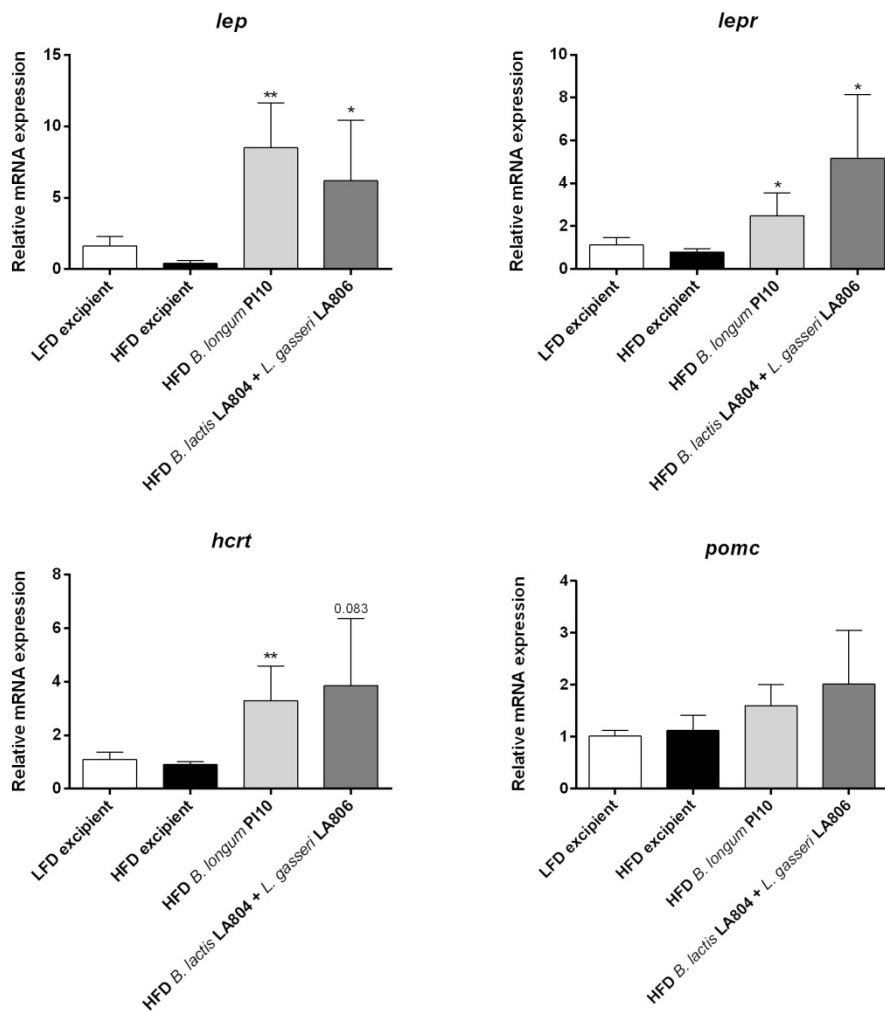
**Figure 5. The probiotic *B. longum* PI10 and the mixture *B. lactis* LA804 / *L. gasseri* LA806 improved fasting glucose and leptin blood levels but not insulin resistance. (A) Fasting glucose level after 13 weeks of diet (in mg/dL) and (B) fasting leptin level (in pg/mL) (C) Glucose tolerance test (GTT) 12 weeks post-diet. Blood glucose levels (mg/dl) were measured after i.p. glucose injection. \* corresponds to regime effect (HFD vs LFD), # corresponds to treatment effect (Probiotic vs Excipient) \* or # p < 0.05; \*\* or ## p < 0.01.**



**Figure 6. Probiotics decreased the gene expression of inflammatory and lipid metabolism markers.** EWAT expression levels of inflammation (*tnfa*) macrophage specific genes (*cd68*), chemo-attractant factor (*mcp-1*) and fatty acids uptake (*cd36*) RT-qPCR (normalized to *bactin* expression). \* corresponds to regime effect (HFD vs LFD), # corresponds to treatment effect (Probiotic vs Excipient) \* or # p < 0.05; \*\* or ## p < 0.01.



**Figure 7. Probiotics modulated small intestine expression of genes involved in inflammation, fatty acid metabolism and bile acids signaling.** Expression levels in jejunum of genes involved (**A**) in macrophage attraction (*mcp-1*), (**B,C**) in uptake of fatty acid (*fabp1*, *cd36*) and in duodenum of genes involved (**D**) in the receptor of bile acids (*tgr5*) and (**E**) proglucagon (*gcg*) \* corresponds to regime effect (HFD vs LFD), # corresponds to treatment effect (Probiotic vs Excipient) \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 8. Probiotics modulated expression of genes involved in food intake in the hypothalamus.** Expression levels of genes involved in food intake (*hcrt*, *pompc*, *lep* and *lepr*). \* corresponds to regime effect (HFD vs LFD), # corresponds to treatment effect (Probiotic vs Excipient) \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

## References

- Alard, J., Lehrter, V., Rhimi, M., Mangin, I., Peucelle, V., Abraham, A.L., Mariadassou, M., Maguin, E., Waligora-Dupriet, A.J., Pot, B., Wolowczuk, I. and Grangette, C., 2016. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environ Microbiol* 18: 1484-1497.
- Andreasen, A.S., Larsen, N., Pedersen-Skovsgaard, T., Berg, R.M., Moller, K., Svendsen, K.D., Jakobsen, M. and Pedersen, B.K., 2010. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr* 104: 1831-1838.
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D. and Raoult, D., 2009. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 4: e7125.
- Banks, W.A., 2001. Leptin transport across the blood-brain barrier: implications for the cause and treatment of obesity. *Curr Pharm Des* 7: 125-133.
- Bateup, J.M., McConnell, M.A., Jenkinson, H.F. and Tannock, G.W., 1995. Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. *Appl Environ Microbiol* 61: 1147-1149.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delmee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J.F., Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C. and Burcelin, R., 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G. and Delzenne, N.M., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58: 1091-1103.
- Cano, P.G., Santacruz, A., Trejo, F.M. and Sanz, Y., 2013. *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. *Obesity (Silver Spring)* 21: 2310-2321.
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Backhed, F. and Mithieux, G., 2014. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 156: 84-96.
- Delzenne, N.M., Neyrinck, A.M., Backhed, F. and Cani, P.D., 2011. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol* 7: 639-646.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J.P., Druart, C., Bindels, L.B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., de Vos, W.M. and Cani, P.D., 2013. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9066-9071.
- Everard, A., Lazarevic, V., Derrien, M., Girard, M., Muccioli, G.G., Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Van Holle, A., Francois, P., de Vos, W.M., Delzenne, N.M., Schrenzel, J. and Cani, P.D., 2011. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60: 2775-2786.
- Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A. and Pot, B., 2007a. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 13: 236-243.



Foligne, B., Zoumpopoulou, G., Dewulf, J., Ben Younes, A., Chareyre, F., Sirard, J.C., Pot, B. and Grangette, C., 2007b. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS ONE* 2: e313.

Foster, J.A. and McVey Neufeld, K.A., 2013. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* 36: 305-312.

Funato, H., Tsai, A.L., Willie, J.T., Kisanuki, Y., Williams, S.C., Sakurai, T. and Yanagisawa, M., 2009. Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. *Cell Metab* 9: 64-76.

Furuhashi, M. and Hotamisligil, G.S., 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7: 489-503.

Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R.E., Martin, R.J., Lefevre, M., Cefalu, W.T. and Ye, J., 2009. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58: 1509-1517.

Habib, A.M., Richards, P., Rogers, G.J., Reimann, F. and Gribble, F.M., 2013. Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia* 56: 1413-1416.

Holowacz, S., Guigne, C., Chene, G., Mouysset, S., Guilbot, A., Seyrig, C. and Dubourdeau, M., 2015. A multispecies *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing probiotic

mixture attenuates body weight gain and insulin resistance after a short-term challenge with a high-fat diet in C57/BL6J mice. *PharmaNutrition* 3: 101-107.

Hsieh, C.Y., Osaka, T., Moriyama, E., Date, Y., Kikuchi, J. and Tsuneda, S., 2015. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol Rep* 3.

Joyce, S.A., Shanahan, F., Hill, C. and Gahan, C.G., 2014. Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: Potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk. *Gut Microbes* 5: 669-674.

Jung, C.H. and Kim, M.S., 2013. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res* 36: 201-207.

Karlsson, F.H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergstrom, G., Behre, C.J., Fagerberg, B., Nielsen, J. and Backhed, F., 2013. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498: 99-103.

Kim, G.B., Miyamoto, C.M., Meighen, E.A. and Lee, B.H., 2004. Cloning and characterization of the bile salt hydrolase genes (bsh) from *Bifidobacterium bifidum* strains. *Appl Environ Microbiol* 70: 5603-5612.

Larsen, N., Vogensen, F.K., van den Berg, F.W., Nielsen, D.S., Andreasen, A.S., Pedersen, B.K., Al-Soud, W.A., Sorensen, S.J., Hansen, L.H. and Jakobsen, M., 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5: e9085.

Lin, H.V., Frassetto, A., Kowalik, E.J., Jr., Nawrocki, A.R., Lu, M.M., Kosinski, J.R., Hubert, J.A., Szeto, D., Yao, X., Forrest, G. and Marsh, D.J., 2012. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One* 7: e35240.

Long, S.L., Gahan, C.G.M. and Joyce, S.A., 2017. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Mol Aspects Med*.

Mariadason, J.M., Catto-Smith, A. and Gibson, P.R., 1999. Modulation of distal colonic epithelial barrier function by dietary fibre in normal rats. *Gut* 44: 394-399.

Martin, R., Laval, L., Chain, F., Miquel, S., Natividad, J., Cherbuy, C., Sokol, H., Verdu, E.F., van Hylckama Vlieg, J., Bermudez-Humaran, L.G., Smokvina, T. and Langella, P., 2016. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM-I2494 Restores Gut Barrier Permeability in Chronically Low-Grade Inflamed Mice. *Front Microbiol* 7: 608.

Millington, G.W., 2007. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)* 4: 18.

Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L. and Raoult, D., 2012. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb Pathog* 53: 100-108.

Neyrinck, A.M., Van Hee, V.F., Piront, N., De Backer, F., Toussaint, O., Cani, P.D. and Delzenne, N.M., 2012. Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satietogenic gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice. *Nutr Diabetes* 2: e28.

Ogawa, A., Kadooka, Y., Kato, K., Shirouchi, B. and Sato, M., 2014. *Lactobacillus gasserii* SBT2055 reduces postprandial and fasting serum non-esterified fatty acid levels in Japanese hypertriacylglycerolemic subjects. *Lipids Health Dis* 13: 36.

Park, H.K. and Ahima, R.S., 2015. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism* 64: 24-34.

Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C.F., Funai, K., Hayashi, D.K., Lyle, B.J., Martini, M.C., Ursell, L.K., Clemente, J.C., Van Treuren, W., Walters, W.A., Knight, R., Newgard, C.B., Heath, A.C. and Gordon, J.I., 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341: 1241214.

Rindi, G., Grant, S.G., Yiangou, Y., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Batach, V.L., Solcia, E. and Polak, J.M., 1990. Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am J Pathol* 136: 1349-1363.

Saez-Lara, M.J., Robles-Sanchez, C., Ruiz-Ojeda, F.J., Plaza-Diaz, J. and Gil, A., 2016. Effects of Probiotics and Synbiotics on Obesity, Insulin Resistance Syndrome, Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Human Clinical Trials. *Int J Mol Sci* 17.

Thaiss, C.A., Itav, S., Rothschild, D., Meijer, M., Levy, M., Moresi, C., Dohnalova, L., Braverman, S., Rozin, S., Malitsky, S., Dori-Bachash, M., Kuperman, Y., Biton, I., Gertler, A., Harmelin, A., Shapiro, H., Halpern, Z., Aharoni, A., Segal, E. and Elinav, E., 2016. Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting weight regain. *Nature*.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. and Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.

van Nierop, F.S., Scheltema, M.J., Eggink, H.M., Pols, T.W., Sonne, D.P., Knop, F.K. and Soeters, M.R., 2016. Clinical relevance of the bile acid receptor TGR5 in metabolism. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5: 224-233.

van Swieten, M.M., Pandit, R., Adan, R.A. and van der Plasse, G., 2014. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 61-62: 207-220.

Wahlstrom, A., Sayin, S.I., Marschall, H.U. and Backhed, F., 2016. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab* 24: 41-50.

Wang, J., Tang, H., Zhang, C., Zhao, Y., Derrien, M., Rocher, E., van-Hylckama Vlieg, J.E., Strissel, K., Zhao, L., Obin, M. and Shen, J., 2014. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *Isme J* 9(1): 1-15.

Willemsen, L.E., Koetsier, M.A., van Deventer, S.J. and van Tol, E.A., 2003. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut* 52: 1442-1447.

Yadav, H., Lee, J.H., Lloyd, J., Walter, P. and Rane, S.G., 2013. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *J Biol Chem* 288: 25088-25097.

Yakovlieva, M., Tacheva, T., Mihaylova, S., Tropcheva, R., Trifonova, K., Tolesmall ka, C.A., Danova, S. and Vlaykova, T., 2015. Influence of *Lactobacillus brevis* 15 and *Lactobacillus plantarum* 13 on blood glucose and body weight in rats after high-fructose diet. *Benef Microbes* 6: 505-512.

Yin, Y.N., Yu, Q.F., Fu, N., Liu, X.W. and Lu, F.G., 2010. Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. *World J Gastroenterol* 16: 3394-3401.

Zhang, X., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., Chen, Y. and Ji, L., 2013. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One* 8: e71108.

Zou, C. and Shao, J., 2008. Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance. *J Nutr Biochem* 19: 277-286.

**Supplementary Table 1 : Composition of the diet used in the study (g) (source: Research Diets)**

	<b>D12450B: 10% fat (LFD)</b>	<b>D12451: 45% fat (HFD)</b>
Casein, 30 Mesh	200	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	315	72,8
Maltodextrin 10	35	100
Sucrose	350	172,8
Cellulose, BW200	50	50
Soybean Oil	25	25
Lard	20	177,5
Mineral MIX S10026	10	10
Dicalcium Phosphate	13	13
Calcium Carbonate	5,5	5,5
Potassium Citrate, 1 H <sub>2</sub> O	16,5	16,5
Vitamin MIX V10001	10	10
Choline Bitartrate	2	2
FD&C Yellow Dye #5	0,05	0
FD&C Red Dye #40	0	0,05

**Supplementary Table S2 : Forward and reverse primers used in the study**

bact-F	5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAC-3'
bact-R	5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'
tnfa-F	5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCTC-3'
tnfa-R	5'-GGCTACAGGCTTGTCACCTCG-3'
cd36-F	5'-TCATTGCAACTGAGTGG-3'
cd36-R	5'-TCATAAGCTCTGTGTCAG-3'
cd68-F	5'-TGGCGGTGGAATACAATGTG-3'
cd68-R	5'-GATGAATTCTGCGCCATGAA-3'
mcp1-F	5'-TCAGCCAGATGCAGTTAACGC-3'
mcp1-R	5'-TGATCCTCTTGTAGCTCTCCAGC-3'
hert-F	5'-CCGTAACCTACCACCGCTTTAGC-3'
hert-R	5'-AAGAGACTGACAGCGGCGAG-3'
pomc-F	5'-CCGGTGAAGGTGTACCCCAA-3'
pomc-R	5'-TCCAAGCCTAATGGCCGCT-3'
lep-F	5'-AGGATGACACCAAACCCTCAT-3'
lep-R	5'-AGTCCAAGCCAGTGACCCTCT-3'
fabp1-F	5'-CCAATTGCAGAGCCAGGAGA-3'
fabp1-R	5'-CCCCTTGATGTCCTTCCCTTT-3'
tgr5-R	5'-CCCAACTTTTGTTCCTTTCCC-3'
tgr5-F	5'-TAGCCGCACACTTCCATGG-3'
gln-R	5'-AGGGACCTTACCAGTGATGT-3'
gln-F	5'-AATGGCGACTTCTTCTGGGAA-3'

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aagaard, K., Ma, J., Antony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J., and Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine* 6, 237ra65.

Adolph, T.E., Tomczak, M.F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, E., Glickman, J.N., Tschurtschenthaler, M., Hartwig, J., Hosomi, S., et al. (2013). Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* 503, 272–276.

Agerholm-Larsen, L., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, A.S., Manders, M., and Astrup, A. (2000). Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr* 54, 288–297.

de Aguiar Vallim, T.Q., Tarling, E.J., and Edwards, P.A. (2013). Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metabolism* 17, 657.

Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M., Takagi, A., and Koga, Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 93, 2097–2101.

Akira, S. (2006). TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311, 1–16.

Alard, J., Lehrter, V., Rhimi, M., Mangin, I., Peucelle, V., Abraham, A.-L., Mariadassou, M., Maguin, E., Waligora-Dupriet, A.-J., Pot, B., et al. (2016). Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environmental Microbiology* 18, 1484–1497.

Allen-Vercoe, E., and Jobin, C. (2014). *Fusobacterium* and *Enterobacteriaceae*: Important players for CRC? *Immunology Letters* 162, 54.

Alvarez-Olmos, M.I., and Oberhelman, R.A. (2001). Probiotic Agents and Infectious Diseases: A Modern Perspective on a Traditional Therapy. *Clin Infect Dis* 32, 1567–1576.

Amano, A., Nakagawa, I., and Yoshimori, T. (2006). Autophagy in Innate Immunity against Intracellular Bacteria. *J Biochem* 140, 161–166.

Anderson, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W.C., Park, Z., McCann, M.J., Kelly, W.J., and Roy, N.C. (2010). *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiology* 10, 316.

Angelakis, E., and Raoult, D. (2010). The Increase of *Lactobacillus* Species in the Gut Flora of Newborn Broiler Chicks and Ducks Is Associated with Weight Gain. *PLoS ONE* 5.

Aoki, R., Kamikado, K., Suda, W., Takii, H., Mikami, Y., Suganuma, N., Hattori, M., and Koga, Y. (2017). A proliferative probiotic *Bifidobacterium* strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. *Scientific Reports* 7, 43522.

Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., et al. (2001). Stomach Is a Major Source of Circulating Ghrelin, and Feeding State Determines Plasma Ghrelin-Like Immunoreactivity Levels in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4753–4758.

Ashcroft, F.M. (2006). K[ATP] channels and insulin secretion: a key role in health and disease. *Biochemical Society Transactions* 34, 243–246.

Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., et al. (2008). ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 455, 808–812.

Avram, M.M., Avram, A.S., and James, W.D. (2007). Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J. Am. Acad. Dermatol.* 56, 472–492.

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS* 101, 15718–15723.

Badman, M.K., and Flier, J.S. (2005). The Gut and Energy Balance: Visceral Allies in the Obesity Wars. *Science* 307, 1909–1914.

Bakken, J.S., Borody, T., Brandt, L.J., Brill, J.V., Demarco, D.C., Franzos, M.A., Kelly, C., Khoruts, A., Louie, T., Martinelli, L.P., et al. (2011). Treating *Clostridium difficile* Infection with Fecal Microbiota Transplantation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 9, 1044.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 18, 767–811.

Barbara, G., Zecchi, L., Barbaro, R., Cremon, C., Bellacosa, L., Marcellini, M., De Giorgio, R., Corinaldesi, R., and Stanghellini, V. (2012). Mucosal permeability and immune activation as potential therapeutic targets of probiotics in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 46 *Suppl*, S52-55.

Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., et al. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 17, 200–205.

Basdevant, A. (2006). L'obésité: origines et conséquences d'une épidémie. *Comptes Rendus Biologies* 329, 562–569.

Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiological Reviews* 84, 869–901.

Beaugerie, L., and Sokol, H. (2014). Les fondamentaux de la pathologie digestive.

Benach, J.L., Li, E., and McGovern, M.M. (2012). A Microbial Association with Autism. *mBio* 3.

Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., et al. (2010). Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians. *PLoS ONE* 5.

Bindels, L.B., Delzenne, N.M., Cani, P.D., and Walter, J. (2015). Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 303–310.

Bischoff, S.C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., and Wells, J.M. (2014). Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology* 14.

Biswas, D., Qureshi, O.S., Lee, W.-Y., Croudace, J.E., Mura, M., and Lammas, D.A. (2008). ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunology* 9, 35.

Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., et al. (2009). Origin of the Lamina Propria Dendritic Cell Network. *Immunity* 31, 513.

Bomhof, M.R., Saha, D.C., Reid, D.T., Paul, H.A., and Reimer, R.A. (2014). Combined effects of oligofructose and *Bifidobacterium animalis* on gut microbiota and glycemia in obese rats. *Obesity* 22, 763–771.

Bouassida, A., Zalleg, D., Bouassida, S., Zaouali, M., Feki, Y., Zbidi, A., and Tabka, Z. (2006). Leptin, its Implication in Physical Exercise and Training: A Short Review. *J Sports Sci Med* 5, 172–181.

Bouchard, C., Tremblay, A., Després, J.-P., Nadeau, A., Lupien, P.J., Thériault, G., Dussault, J., Moorjani, S., Pinault, S., and Fournier, G. (1990). The Response to Long-Term Overfeeding in Identical Twins. *The New England Journal of Medicine* 322, 1477–1482.

Bouladoux, N., Hand, T.W., Naik, S., and Belkaid, Y. (2013). Microbiote et lymphocytes T: les meilleurs ennemis. *Medecine Sciences : M/S* 29.

Braat, H., Brande, J. van den, Tol, E. van, Hommes, D., Peppelenbosch, M., and Deventer, S. van (2004). *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4<sup>+</sup> T cells via modulation of dendritic cell function. *Am J Clin Nutr* 80, 1618–1625.

Brahe, L.K., Chatelier, E.L., Prifti, E., Pons, N., Kennedy, S., Blædel, T., Håkansson, J., Dalsgaard, T.K., Hansen, T., Pedersen, O., et al. (2015). Dietary modulation of the gut microbiota – a randomised controlled trial in obese postmenopausal women. *The British Journal of Nutrition* 114, 406.

Bruun, J.M., Lihn, A.S., Verdich, C., Pedersen, S.B., Toubro, S., Astrup, A., and Richelsen, B. (2003). Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 285, E527–E533.

Burcelin, R., Costa, A.D., Drucker, D., and Thorens, B. (2001). Glucose Competence of the Hepatoportal Vein Sensor Requires the Presence of an Activated Glucagon-Like Peptide-1 Receptor. *Diabetes* 50, 1720–1728.

Burcelin, R., Knauf, C., and Cani, P.D. (2008). Pancreatic  $\alpha$ -cell dysfunction in diabetes. *Diabetes & Metabolism* 34, S49–S55.

Caballero-Franco, C., Keller, K., Simone, C.D., and Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G315–G322.

Cabarrocas, J., Savidge, T.C., and Liblau, R.S. (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41, 81–93.

Cadioux, P.A., Burton, J., Devillard, E., and Reid, G. (2009). Lactobacillus by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 6, 13–18.

Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., et al. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456, 259–263.

Campbell, A.W. (2014). Autoimmunity and the Gut. *Autoimmune Diseases* 2014.

Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A.-J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C., and Butel, M.-J. (2007). Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 31, 533–542.

Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2009). Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Current Opinion in Pharmacology* 9, 737–743.

Cani, P.D., Holst, J.J., Drucker, D.J., Delzenne, N.M., Thorens, B., Burcelin, R., and Knauf, C. (2007a). GLUT2 and the incretin receptors are involved in glucose-induced incretin secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology* 276, 18–23.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007b). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772.

Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R.G., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., and Delzenne, N.M. (2007c). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374–2383.

Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57, 1470–1481.

Capasso, R., and Izzo, A.A. (2008). Gastrointestinal Regulation of Food Intake: General Aspects and Focus on Anandamide and Oleoylethanolamide. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 39–46.

Chechi, K., Carpentier, A.C., and Richard, D. (2013). Understanding the brown adipocyte as a contributor to energy homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 24, 408–420.



Chen, Z., Vigueira, P.A., Chambers, K.T., Hall, A.M., Mitra, M.S., Qi, N., McDonald, W.G., Colca, J.R., Kletzien, R.F., and Finck, B.N. (2012). Insulin resistance and metabolic derangements in obese mice are ameliorated by a novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -sparing thiazolidinedione. *J. Biol. Chem.* 287, 23537–23548.

Cherrier, M. (2014). Les cellules lymphoïdes innées - De nouveaux acteurs de la réponse immune mucoale. *Med Sci (Paris)* 30, 280–288.

Choi, S.-S., Park, J., and Choi, J.H. (2014). Revisiting PPAR $\gamma$  as a target for the treatment of metabolic disorders. *BMB Rep* 47, 599–608.

Christensen, H.R., Frøkiær, H., and Pestka, J.J. (2002). Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 168, 171–178.

Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S.E., Benoist, C., and Mathis, D. (2012). PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486, 549–553.

Clarke, S.F., Murphy, E.F., O’Sullivan, O., Ross, R.P., O’Toole, P.W., Shanahan, F., and Cotter, P.D. (2013). Targeting the microbiota to address diet-induced obesity: a time dependent challenge. *PLoS ONE* 8, e65790.

Claus, S.P., Ellero, S.L., Berger, B., Krause, L., Bruttin, A., Molina, J., Paris, A., Want, E.J., Waziers, I. de, Cloarec, O., et al. (2011). Colonization-Induced Host-Gut Microbial Metabolic Interaction. *mBio* 2.

Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.-M., et al. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398–401.

Clevers, H.C., and Bevins, C.L. (2013). Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annual Review of Physiology* 75, 289–311.

Coconnier, M.H., Liévin, V., Bernet-Camard, M.F., Hudault, S., and Servin, A.L. (1997). Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 1046.

Collins, S.M., Surette, M., and Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology* 10, 735–742.

Colman, R.J., and Rubin, D.T. (2014). Fecal Microbiota Transplantation as Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Crohn’s & Colitis* 8, 1569.

Cone, R.A. (2009). Barrier properties of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 75–85.

Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., et al. (2009). Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans.

Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J.P., Campbell, B.J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature Medicine* *16*, 90–97.

Corfield, A.P., Carroll, D., Myerscough, N., and Probert, C.S.J. (2001). Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. - PubMed - NCBI.

Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., and Gahan, C.G.M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 7617–7621.

Corthay, A. (2009). How do Regulatory T Cells Work? *Scandinavian Journal of Immunology* *70*, 326.

Cosnes, J., Carbonnel, F., Beaugerie, L., Le Quintrec, Y., and Gendre, J. (1996). Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology* *110*, 424–431.

Daddaoua, A., Puerta, V., Requena, P., Martínez-Férez, A., Guadix, E., Medina, F.S. de, Zarzuelo, A., Suárez, M.D., Boza, J.J., and Martínez-Augustin, O. (2006). Goat Milk Oligosaccharides Are Anti-Inflammatory in Rats with Hapten-Induced Colitis. *J. Nutr.* *136*, 672–676.

Daillère, R., Vétizou, M., Waldschmitt, N., Yamazaki, T., Isnard, C., Poirier-Colame, V., Duong, C.P.M., Flament, C., Lepage, P., Roberti, M.P., et al. (2016). *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects. *Immunity* *45*, 931–943.

Dao, M.C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E.O., Kayser, B.D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyle, L., et al. (2016). *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* *65*, 426–436.

Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans\*This work was supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, Japan, and the Ministry of Health and Welfare, Japan (to M.N.). *Endocrinology* *141*, 4255–4261.

Davies, P. (2011). Portrait of Doctor Boucard. *BMJ* *342*, d3920.

Degrolamo, C., Rainaldi, S., Bovenga, F., Murzilli, S., and Moschetta, A. (2014). Microbiota modification with probiotics induces hepatic bile acid synthesis via downregulation of the Fxr-Fgf15 axis in mice. *Cell Rep* *7*, 12–18.

Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *5*, 261–270.

Dennis-Wall, J.C., Culpepper, T., Nieves, C., Rowe, C.C., Burns, A.M., Rusch, C.T., Federico, A., Ukhanova, M., Waugh, S., Mai, V., et al. (2017). Probiotics (Lactobacillus gasseri KS-13, Bifidobacterium bifidum G9-1, and Bifidobacterium longum MM-2) improve rhinoconjunctivitis-specific quality of life in individuals with seasonal allergies: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Am J Clin Nutr* 105, 758–767.

Deretic, V. (2012). Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Current Opinion in Immunology* 24, 21.

Després, J.-P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887.

Deurenberg, P., Weststrate, J.A., and Seidell, J.C. (1991). Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex-specific prediction formulas.

Drouault-Holowacz, S., Bieuvelet, S., Burckel, A., Cazaubiel, M., Dray, X., and Marteau, P. (2008). A double blind randomized controlled trial of a probiotic combination in 100 patients with irritable bowel syndrome. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 32, 147–152.

Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., et al. (2006). A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science (New York, N.Y.)* 314, 1461.

Duncan, S.H., Scott, K.P., Ramsay, A.G., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Stewart, C.S., and Flint, H.J. (2003). Effects of Alternative Dietary Substrates on Competition between Human Colonic Bacteria in an Anaerobic Fermentor System. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1136.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., et al. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 73, 386s–392s.

Eberl, G. (2005). Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? *Nature Reviews Immunology* 5, 413–420.

Ejtahed, H.S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., Mofid, V., and Akbarian-Moghari, A. (2011). Effect of probiotic yogurt containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Dairy Science* 94, 3288–3294.

Ekobom, A., and Montgomery, S.M. (2004). Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 18, 497–508.

Ellinghaus, D., Ellinghaus, E., Nair, R.P., Stuart, P.E., Esko, T., Metspalu, A., Debrus, S., Raelson, J.V., Tejasvi, T., Belouchi, M., et al. (2012). Combined Analysis of Genome-wide Association Studies for Crohn Disease and Psoriasis Identifies Seven Shared Susceptibility Loci. *American Journal of Human Genetics* 90, 636.

Emery, C., Dinet, J., Lafuma, A., Sermet, C., Khoshnood, B., and Fagnani, F. (2007). Évaluation du coût associé à l'obésité en France. *La Presse Médicale* 36, 832–840.

Erridge, C., Attina, T., Spickett, C.M., and Webb, D.J. (2007). A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* 86, 1286–1292.

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J.P., Druart, C., Bindels, L.B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., et al. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS* 110, 9066–9071.

Everard, A., Lazarevic, V., Gaïa, N., Johansson, M., Ståhlman, M., Backhed, F., Delzenne, N.M., Schrenzel, J., François, P., and Cani, P.D. (2014). Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *The ISME Journal* 8, 2116.

Evivie, S.E., Huo, G.-C., Igene, J.O., and Bian, X. (2017). Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food & Nutrition Research* 61.

FAO/WHO (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria – Joint FAO/WHO Expert Consultation.

Farmer, S.R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism* 4, 263.

Fernandes, J., Su, W., Rahat-Rozenbloom, S., Wolever, T.M.S., and Comelli, E.M. (2014). Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. *Nutrition & Diabetes* 4, e121.

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 15, 930–939.

Fihn, B., Sjöqvist, A., and Jodal, M. (2000). Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: Effects of glucose transport. *Gastroenterology* 119, 1029–1036.

Fisberg, M., and Machado, R. (2015). History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutr Rev* 73, 4–7.

Flegal, K.M., Carroll, M.D., Ogden, C.L., and Curtin, L.R. (2010). Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. *JAMA* 303, 235–241.

Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., and Duncan, S.H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 9, 577–589.

Foligne, B., Zoumpopoulou, G., Dewulf, J., Ben Younes, A., Chareyre, F., Sirard, J.-C., Pot, B., and Grangette, C. (2007a). A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality. *PLoS ONE* 2, e313.

Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., and Pot, B. (2007b). Correlation between in vitro and in vivo

immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 13, 236–243.

Frank, D.N., Amand, A.L.S., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13780.

Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010). Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn's Disease Susceptibility Loci. *Nature Genetics* 42, 1118.

Fried, S.K., Bunkin, D.A., and Greenberg, A.S. (1998). Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83, 847–850.

Frolova, L., Drastich, P., Rossmann, P., Klimesova, K., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Expression of Toll-like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in Biopsy Samples of Patients With Inflammatory Bowel Diseases: Upregulated Expression of TLR2 in Terminal Ileum of Patients With Ulcerative Colitis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 56, 267.

Fruebis, J., Tsao, T.-S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R.S., Yen, F.T., Bihain, B.E., and Lodish, H.F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2005.

Fryirs, M., Barter, P.J., and Rye, K. (2009). Cholesterol metabolism and pancreatic  $\beta$ -cell function. *Current Opinion in Lipidology* 20, 159–164.

Fuentes, S., Egert, M., Jiménez-Valera, M., Ramos-Cormenzana, A., Ruiz-Bravo, A., Smidt, H., and Monteoliva-Sanchez, M. (2008). Administration of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Research in Microbiology* 159, 237–243.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365–378.

Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., et al. (2009). The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity* 31, 677–689.

Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews. Immunology* 12, 503.

Gaudier, E., Michel, C., Segain, J.-P., Cherbut, C., and Hoebler, C. (2005). The VSL# 3 Probiotic Mixture Modifies Microflora but Does Not Heal Chronic Dextran-Sodium Sulfate-Induced Colitis or Reinforce the Mucus Barrier in Mice. *J. Nutr.* 135, 2753–2761.

Getty-Kaushik, L., Song, D.H., Boylan, M.O., Corkey, B.E., and Wolfe, M.M. (2006). Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Modulates Adipocyte Lipolysis and Reesterification. *Obesity* 14, 1124–1131.

Ghouri, Y.A., Richards, D.M., Rahimi, E.F., Krill, J.T., Jelinek, K.A., and DuPont, A.W. (2014). Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 7, 473.

Gibson, G.R., and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412.

Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A., and Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics.

Gillor, O., Giladi, I., and Riley, M.A. (2009). Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. *BMC Microbiology* 9, 165.

Gøbel, R.J., Larsen, N., Jakobsen, M., Mølgaard, C., and Michaelsen, K.F. (2012). Probiotics to adolescents with obesity: effects on inflammation and metabolic syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 55, 673–678.

Gómez-Gallego, C., Pohl, S., Salminen, S., De Vos, W.M., and Kneifel, W. (2016). *Akkermansia muciniphila*: a novel functional microbe with probiotic properties. *Benef Microbes* 7, 571–584.

Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H.S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 67, 207–216.

Goto, Y., and Kiyono, H. (2012). Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunological Reviews* 245, 147–163.

Greiner, T., and Bäckhed, F. (2011). Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 117–123.

Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2011). Brain–Gut–Microbe Communication in Health and Disease. *Frontiers in Physiology* 2.

Grider, J.R. (1994). Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility. *J. Nutr.* 124, 1334S–1339S.

Grube, D. (1986). The endocrine cells of the digestive system: amines, peptides, and modes of action. *Anat Embryol* 175, 151–162.

Guarino, A., Canani, R.B., Spagnuolo, M.I., Albano, F., and Di Benedetto, L. (1997). Oral Bacterial Therapy Reduces the Duration of Symptoms and of Viral Excretion in Children with Mild Diarrhea. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 25, 516–519.

Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., and Czech, M.P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, 367.

Guo, S. (2014). Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms. *The Journal of Endocrinology* 220, T1.

Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., and Testoni, P.A. (2000). *Saccharomyces boulardii* in Maintenance Treatment of Crohn's Disease. *Dig Dis Sci* 45, 1462–1464.

Gutierrez-Aguilar, R., and Woods, S.C. (2011). Nutrition and L and K-enteroendocrine cells. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 18.

Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543–546.

Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., and Järnerot, G. (2003). Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 124, 1767–1773.

Hamaguchi, M., and Sakaguchi, S. (2012). Regulatory T cells expressing PPAR- $\gamma$  control inflammation in obesity. *Cell Metab.* 16, 4–6.

Hameed, S., Dhillon, W., and Bloom, S. (2009). Gut hormones and appetite control. *Oral Diseases* 15, 18–26.

Hand, K.V., Bruen, C.M., O'Halloran, F., Panwar, H., Calderwood, D., Giblin, L., and Green, B.D. (2012). Examining acute and chronic effects of short- and long-chain fatty acids on peptide YY (PYY) gene expression, cellular storage and secretion in STC-1 cells. *Eur J Nutr* 52, 1303–1313.

Hansen, C.H.F., Krych, L., Nielsen, D.S., Vogensen, F.K., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Buschard, K., and Hansen, A.K. (2012). Early life treatment with vancomycin propagates *Akkermansia muciniphila* and reduces diabetes incidence in the NOD mouse. *Diabetologia* 55, 2285–2294.

Harach, T., Pols, T.W.H., Nomura, M., Maida, A., Watanabe, M., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2012). TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Sci Rep* 2, 430.

Herman, M.A., and Kahn, B.B. (2006). Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *Journal of Clinical Investigation* 116, 1767.

Hevener, A.L., Bergman, R.N., and Donovan, C.M. (1997). Novel Glucosensor for Hypoglycemic Detection Localized to the Portal Vein. *Diabetes* 46, 1521–1525.

Hoffmann, A.R., Proctor, L.M., Surette, M.G., and Suchodolski, J.S. (2016). The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Veterinary Pathology* 53, 10–21.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 73, 365s–373s.

Honda, K., and Littman, D.R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 535, 75–84.

Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., and Gordon, J.I. (2001). Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science* 291, 881–884.

Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.

Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 95, 2409.

Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., et al. (2000). Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20, 1595–1599.

Hsieh, J., Longuet, C., Maida, A., Bahrami, J., Xu, E., Baker, C.L., Brubaker, P.L., Drucker, D.J., and Adeli, K. (2009). Glucagon-Like Peptide-2 Increases Intestinal Lipid Absorption and Chylomicron Production via CD36. *Gastroenterology* 137, 997–1005.e4.

Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ Is a Novel Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity. *J. Biol. Chem.* 271, 10697–10703.

Hudault, S., Liévin, V., Bernet-Camard, M.F., and Servin, A.L. (1997). Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 513.

Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411, 599–603.

Hummel, S., Veltman, K., Cichon, C., Sonnenborn, U., and Schmidt, M.A. (2012). Differential Targeting of the E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Complex by Gram-Positive Probiotic *Lactobacilli* Improves Epithelial Barrier Function. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1140.

Hyde, R. (2008). Europe battles with obesity. *The Lancet* 371, 2160–2161.

Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., et al. (2003). Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2 IMPLICATIONS FOR CROHN’S DISEASE. *J. Biol. Chem.* 278, 5509–5512.



Ishikawa, H., Akedo, I., Umesaki, Y., Tanaka, R., Imaoka, A., and Otani, T. (2003). Randomized Controlled Trial of the Effect of Bifidobacteria-Fermented Milk on Ulcerative Colitis. *Journal of the American College of Nutrition*.

Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* *139*, 485.

Ivey, K.L., Hodgson, J.M., Kerr, D.A., Lewis, J.R., Thompson, P.L., and Prince, R.L. (2014). The effects of probiotic bacteria on glycaemic control in overweight men and women: a randomised controlled trial. *Eur J Clin Nutr* *68*, 447–452.

Ivey, K.L., Hodgson, J.M., Kerr, D.A., Thompson, P.L., Stojceski, B., and Prince, R.L. (2015). The effect of yoghurt and its probiotics on blood pressure and serum lipid profile; a randomised controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* *25*, 46–51.

Jager, P.L.D., Franchimont, D., Waliszewska, A., Bitton, A., Cohen, A., Langelier, D., Belaiche, J., Vermeire, S., Farwell, L., Goris, A., et al. (2007). The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes and Immunity* *8*, 387–397.

Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* *20*, 197–216.

Jégou, S., Mounien, L., Boutelet, I., and Vaudry, H. (2003). Le peptide YY3-36, une nouvelle arme thérapeutique contre l'obésité? *M/S : médecine sciences* *19*, 537–539.

Jørgensen, M.R., Kragelund, C., Jensen, P.Ø., Keller, M.K., and Twetman, S. (2017). Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species in vitro. *Journal of Oral Microbiology* *9*.

Kabir, A.M., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miwa, T., and Koga, Y. (1997). Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* *41*, 49.

Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., Okano, M., Kagoshima, M., and Tsuchida, T. (2010). Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* *64*, 636–643.

Kadooka, Y., Sato, M., Ogawa, A., Miyoshi, M., Uenishi, H., Ogawa, H., Ikuyama, K., Kagoshima, M., and Tsuchida, T. (2013). Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* *110*, 1696–1703.

Karska-Wysocki, B., Bazo, M., and Smoragiewicz, W. (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiological Research* *165*, 674–686.

Katsuma, S., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2005). Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *329*, 386–390.

Keersmaecker, D., C.j, S., Verhoeven, T.L.A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., and Nagy, I. (2006). Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett* 259, 89–96.

Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S., and Mantzoros, C.S. (2010). Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann. Intern. Med.* 152, 93–100.

Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., and Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 280, E745–E751.

Kieffer, T.J., and Habener, J.F. (2000). The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic  $\beta$ -cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 278, E1–E14.

Kim, K., Park, M., Lee, Y.M., Rhyu, M.R., and Kim, H.Y. (2014). Ginsenoside metabolite compound K stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in NCI-H716 cells via bile acid receptor activation. *Arch. Pharm. Res.* 37, 1193–1200.

Kim, S.-J., Nian, C., and McIntosh, C.H.S. (2007). Activation of Lipoprotein Lipase by Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide in Adipocytes A ROLE FOR A PROTEIN KINASE B, LKB1, AND AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE CASCADE. *J. Biol. Chem.* 282, 8557–8567.

Kim, S.-J., Nian, C., and McIntosh, C.H.S. (2010). GIP increases human adipocyte LPL expression through CREB and TORC2-mediated trans-activation of the LPL gene. *Journal of Lipid Research* 51, 3145.

Klover, P.J., Zimmers, T.A., Koniaris, L.G., and Mooney, R.A. (2003). Chronic Exposure to Interleukin-6 Causes Hepatic Insulin Resistance in Mice. *Diabetes* 52, 2784–2789.

Knauf, C., Cani, P.D., Kim, D.-H., Iglesias, M.A., Chabo, C., Waget, A., Colom, A., Rastrelli, S., Delzenne, N.M., Drucker, D.J., et al. (2008). Role of Central Nervous System Glucagon-Like Peptide-1 Receptors in Enteric Glucose Sensing. *Diabetes* 57, 2603.

Ko, H.-J., and Chang, S.-Y. (2015). Regulation of Intestinal Immune System by Dendritic Cells. *Immune Network* 15, 1.

Krause, R., Moissl-Eichinger, C., Halwachs, B., Gorkiewicz, G., Berg, G., Valentin, T., Prattes, J., Högenauer, C., and Zollner-Schwetz, I. (2016). Mycobiome in the Lower Respiratory Tract – A Clinical Perspective. *Frontiers in Microbiology* 7.

Kruis, W., Frič, P., Pokrotnieks, J., Lukáš, M., Fixa, B., Kaščák, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., et al. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617.

Kulecka, M., Paziewska, A., Zeber-Lubecka, N., Ambrozkiewicz, F., Kopczynski, M., Kuklinska, U., Pysniak, K., Gajewska, M., Mikula, M., and Ostrowski, J. (2016). Prolonged

transfer of feces from the lean mice modulates gut microbiota in obese mice. *Nutrition & Metabolism* 13.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*.

Kuo, L.E., Kitlinska, J.B., Tilan, J.U., Li, L., Baker, S.B., Johnson, M.D., Lee, E.W., Burnett, M.S., Fricke, S.T., Kvetnansky, R., et al. (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 13, 803–811.

Lal, S., Kirkup, A.J., Brunsdon, A.M., Thompson, D.G., and Grundy, D. (2001). Vagal afferent responses to fatty acids of different chain length in the rat. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 281, G907–G915.

Lal-Nag, M., and Morin, P.J. (2009). The claudins. *Genome Biology* 10, 235.

Lam, E.K.Y., Yu, L., Wong, H.P.S., Wu, W.K.K., Shin, V.Y., Tai, E.K.K., So, W.H.L., Woo, P.C.Y., and Cho, C.H. (2007). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. *European Journal of Pharmacology* 565, 171–179.

Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cellular Microbiology* 12, 99–113.

Lara-Villoslada, F., Debras, E., Nieto, A., Concha, A., Gálvez, J., López-Huertas, E., Boza, J., Obled, C., and Xaus, J. (2006). Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clinical Nutrition* 25, 477–488.

Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 30, 294–309.

Larsen, N., Vogensen, F.K., Gøbel, R.J., Michaelsen, K.F., Forssten, S.D., Lahtinen, S.J., and Jakobsen, M. (2013). Effect of *Lactobacillus salivarius* Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. *Clinical Nutrition* 32, 935–940.

Lee, B., Lee, J.-H., Lee, H.-S., Bae, E.-A., Huh, C.-S., Ahn, Y.-T., and Kim, D.-H. (2009). Glycosaminoglycan degradation-inhibitory lactic acid bacteria ameliorate 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 616–621.

Lee, G.-H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., and Friedman, J.M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632–635.

Lepargneur, J.-P. (2016). *Lactobacillus crispatus*, biomarqueur de l'écosystème vaginal sain. *Annales de Biologie Clinique* 74, 421–427.

Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* 102, 11070–11075.

Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.

Li, Z., Jin, H., Oh, S.Y., and Ji, G.E. (2016). Anti-obese effects of two Lactobacilli and two Bifidobacteria on ICR mice fed on a high fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480, 222–227.

Lilly, D.M., and Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* 147, 747–748.

Lindén, S.K., Florin, T.H.J., and McGuckin, M.A. (2008). Mucin Dynamics in Intestinal Bacterial Infection. *PLoS ONE* 3.

Ling, Y.M., Shaw, M.H., Ayala, C., Coppens, I., Taylor, G.A., Ferguson, D.J.P., and Yap, G.S. (2006). Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 2063.

Liston, A., and Masters, S.L. (2017). Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nature Reviews Immunology* 17, 208–214.

Liu, J., Chen, F., Qiu, S.-Q., Yang, L.-T., Zhang, H.-P., Liu, J.-Q., Geng, X.-R., Yang, G., Liu, Z.-Q., Li, J., et al. (2016). Probiotics enhance the effect of allergy immunotherapy on regulating antigen specific B cell activity in asthma patients. *American Journal of Translational Research* 8, 5256.

Liu, M., Seino, S., and Kirchgessner, A.L. (1999). Identification and Characterization of Glucoreponsive Neurons in the Enteric Nervous System. *J. Neurosci.* 19, 10305–10317.

Lu, Y., Fan, C., Li, P., Lu, Y., Chang, X., and Qi, K. (2016). Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Protein-coupled Receptors and Gut Microbiota. *Sci Rep* 6, 37589.

Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 276, G941–G950.

Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology* 4, 478–485.

Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K., and Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and Infection* 3, 1021–1035.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., and Clark, D.P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*, 12th Edition.

Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., and Vesikari, T. (1995). Lactic Acid Bacteria in the Treatment of Acute Rotavirus Gastroenteritis. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 20, 333–338.

Malchow, H.A. (1997). Crohn's Disease and Escherichia coli: A New Approach in Therapy to Maintain Remission of Colonic Crohn's Disease? *Journal of Clinical Gastroenterology* 25, 653–658.

Malnick, S.D.H., and Knobler, H. (2006). The medical complications of obesity. *QJM* 99, 565–579.

Mändar, R. (2013). Microbiota of male genital tract: Impact on the health of man and his partner. *Pharmacological Research* 69, 32–41.

Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., et al. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205.

Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., Hall, N., Peters, W.H.M., Roelofs, R., Boleij, A., and Tjalsma, H. (2011). Towards the Human Colorectal Cancer Microbiome. *PLoS ONE* 6.

Martín, R., Miquel, S., Chain, F., Natividad, J.M., Jury, J., Lu, J., Sokol, H., Theodorou, V., Bercik, P., Verdu, E.F., et al. (2015). Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol* 15.

Martín, R., Laval, L., Chain, F., Miquel, S., Natividad, J., Cherbuy, C., Sokol, H., Verdu, E.F., van Hylckama Vlieg, J., Bermudez-Humaran, L.G., et al. (2016). Bifidobacterium animalis ssp. lactis CNCM-I2494 Restores Gut Barrier Permeability in Chronically Low-Grade Inflamed Mice. *Front Microbiol* 7, 608.

Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., and de La Cochetiere, M.-F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology* 21, 167–173.

Matta, J., Zins, M., Feral-Pierssens, A.L., Carette, C., Ozguler, A., Goldberg, M., and Czernichow, S. (2016). Bulletin épidémiologique hebdomadaire - Prévalence du surpoids, de l'obésité et des facteurs de risque cardio-métaboliques dans la cohorte Constances.

May, T., Mackie, R.I., Fahey, G.C., Cremin, J.C., and Garleb, K.A. (1994). Effect of fiber source on short-chain fatty acid production and on the growth and toxin production by *Clostridium difficile*. *Scand. J. Gastroenterol.* 29, 916–922.

Mazmanian, S.K. (2009). Gut Immune Balance Is as Easy as S-F-B. *Immunity* 31, 536–538.

Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., and Kasper, D.L. (2005). An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 122, 107–118.

McIntosh, C.H.S., Bremsak, I., Lynn, F.C., Gill, R., Hinke, S.A., Gelling, R., Nian, C., McKnight, G., Jaspers, S., and Pederson, R.A. (1999). Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Stimulation of Lipolysis in Differentiated 3T3-L1 Cells: Wortmannin-Sensitive Inhibition by Insulin\*This work was supported by grants from Zymogenetics Inc. (Seattle, WA), the Medical Research Council of Canada (5–90007-RAP/CHSM) and the Canadian Diabetes Association (CHSM/RAP). *Endocrinology* 140, 398–404.

Michalakis, K., Mintziori, G., Kaprara, A., Tarlatzis, B.C., and Goulis, D.G. (2013). The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism* 62, 457–478.

Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L., and Raoult, D. (2012). Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microbial Pathogenesis* 53, 100–108.

Minokoshi, Y., and Kahn, B.B. (2003). Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. *Biochemical Society Transactions* 31, 196–201.

Miyawaki, K., Yamada, Y., Yano, H., Niwa, H., Ban, N., Ihara, Y., Kubota, A., Fujimoto, S., Kajikawa, M., Kuroe, A., et al. (1999). Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: A study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14843.

Mokdad, A.H., Serdula, M.K., Dietz, W.H., Bowman, B.A., Marks, J.S., and Koplan, J.P. (1999). The Spread of the Obesity Epidemic in the United States, 1991-1998. *JAMA* 282, 1519–1522.

Möndel, M., Schroeder, B.O., Zimmermann, K., Huber, H., Nuding, S., Beisner, J., Fellermann, K., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2008). Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human  $\beta$ -defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunol* 2, 166–172.

Moore, W.E.C., and Holdeman, L.V. (1974). Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *Am J Clin Nutr* 27, 1450–1455.

Mora, J.R., and Andrian, U.H. von (2008). Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunology* 1, 96–109.

Moreira, A.P.B., Texeira, T.F.S., Ferreira, A.B., Peluzio, M. do C.G., and Alfenas, R. de C.G. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia.

Moriez, R., Salvador-Cartier, C., Theodorou, V., Fioramonti, J., Eutamene, H., and Bueno, L. (2005). Myosin Light Chain Kinase Is Involved in Lipopolysaccharide-Induced Disruption of Colonic Epithelial Barrier and Bacterial Translocation in Rats. *The American Journal of Pathology* 167, 1071.

Mukhopadhyay, I., Hansen, R., El-Omar, E.M., and Hold, G.L. (2012). IBD—what role do Proteobacteria play? *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 9, 219–230.

Nagata, S., Chiba, Y., Wang, C., and Yamashiro, Y. (2017). The effects of the *Lactobacillus casei* strain on obesity in children: a pilot study. *Benef Microbes* 1–10.

Nakamura, K., Sakuragi, N., Takakuwa, A., and Ayabe, T. (2016). Paneth cell  $\alpha$ -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 35, 57.

Neau, E., Delannoy, J., Marion, C., Cottart, C.-H., Labellie, C., Holowacz, S., Butel, M.-J., Kapel, N., and Waligora-Dupriet, A.-J. (2016). Three Novel Candidate Probiotic Strains with Prophylactic Properties in a Murine Model of Cow's Milk Allergy. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 1722.

Nelson, D.B., Rockwell, L.C., Prioleau, M.D., and Goetzl, L. (2016). The role of the bacterial microbiota on reproductive and pregnancy health. *Anaerobe* 42, 67–73.

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E.C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S.F., et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 384, 766–781.

Ng, S.C., Plamondon, S., Kamm, M.A., Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., Guenther, T., Stagg, A.J., and Knight, S.C. (2010). Immunosuppressive effects via human intestinal dendritic cells of probiotic bacteria and steroids in the treatment of acute ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1286–1298.

Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., and Pettersson, S. (2012). Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science* 336, 1262–1267.

Nielsen, H.B., Almeida, M., Juncker, A.S., Rasmussen, S., Li, J., Sunagawa, S., Plichta, D.R., Gautier, L., Pedersen, A.G., Chatelier, E.L., et al. (2014). Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature Biotechnology* 32, 822–828.

Nusrat, A., Turner, J.R., and Madara, J.L. (2000). IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 279, G851–G857.

Nutrikéo (2014). On y était : Probiota 2014.

ObEpi (2012). ObEpi 2012. Enquête épidémiologique de référence sur l'évolution de l'obésité et du surpoids en France.

Ogunbi, S.O., Ransom, J.A., Sullivan, K., Schoen, B.T., and Gold, B.D. (1998). Inflammatory bowel disease in African-American children living in Georgia. *The Journal of Pediatrics* 133, 103–107.

Ohno, H. (2016). Featured: Intestinal M cells. *Journal of Biochemistry* 159, 151.

Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.-K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein. *Science* 278, 135–138.

OMS (1997). Organisation mondiale de la santé.

OMS (2003). Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale.

O'Neill, L.A.J., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 7, 353–364.

Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., and Wayner, M.J. (1969). Glucose and Osmosensitive Neurones of the Rat Hypothalamus. *Nature* 222, 282–284.

Ottaviani, E., Malagoli, D., and Franceschi, C. (2011). The evolution of the adipose tissue: A neglected enigma. *General and Comparative Endocrinology* 174, 1–4.

Ottman, N., Smidt, H., Vos, W.M. de, and Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2.

Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Okamoto, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Muraguchi, M., et al. (2000). Adiponectin, an Adipocyte-Derived Plasma Protein, Inhibits Endothelial NF- $\kappa$ B Signaling Through a cAMP-Dependent Pathway. *Circulation* 102, 1296–1301.

Ozen, M., and Dinleyici, E.C. (2015). The history of probiotics: the untold story. *Beneficial Microbes*.

Park, H.-K., and Ahima, R.S. (2014). Leptin signaling. *F1000Prime Rep* 6, 73.

Park, S., and Bae, J.-H. (2015). Probiotics for weight loss: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Res* 35, 566–575.

Park, S., Ji, Y., Jung, H.-Y., Park, H., Kang, J., Choi, S.-H., Shin, H., Hyun, C.-K., Kim, K.-T., and Holzapfel, W.H. (2017). *Lactobacillus plantarum* HAC01 regulates gut microbiota and adipose tissue accumulation in a diet-induced obesity murine model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 1605–1614.

Parséus, A., Sommer, N., Sommer, F., Caesar, R., Molinaro, A., Ståhlman, M., Greiner, T.U., Perkins, R., and Bäckhed, F. (2017). Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut* 66, 429–437.

Pavlović, N., Stankov, K., and Mikov, M. (2012). Probiotics--interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 1880–1895.

Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540–543.

Peloquin, J.M., and Nguyen, D.D. (2013). The Microbiota and Inflammatory Bowel Disease: Insights from Animal Models. *Anaerobe* 24.

Petriz, B.A., and Franco, O.L. (2017). Metaproteomics as a Complementary Approach to Gut Microbiota in Health and Disease. *Front. Chem.* 5.

Phillips, R.J., and Powley, T.L. (2007). INNERVATION OF THE GASTROINTESTINAL TRACT: PATTERNS OF AGING. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 136, 1.

Philpott, D.J., Sorbara, M.T., Robertson, S.J., Croitoru, K., and Girardin, S.E. (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 14, 9–23.



Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E., and Ridker, P.M. (2001). C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA* 286, 327–334.

Preidis, G.A., and Versalovic, J. (2009). Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. *Gastroenterology* 136, 2015.

Prosberg, M., Bendtsen, F., Vind, I., Petersen, A.M., and Gluud, L.L. (2016). The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.

Pryde, S.E., Duncan, S.H., Hold, G.L., Stewart, C.S., and Flint, H.J. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters* 217, 133–139.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., et al. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60.

Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P.C., Klinder, A., O’Riordan, M., O’Sullivan, G.C., Pool-Zobel, B., et al. (2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 85, 488–496.

Rajkumar, H., Mahmood, N., Kumar, M., Varikuti, S.R., Challa, H.R., and Myakala, S.P. (2014). Effect of probiotic (VSL#3) and omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: a randomized, controlled trial. *Mediators Inflamm.* 2014, 348959.

Ramsay, T.G. (1996). FAT CELLS. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 25, 847–870.

Rehman, A., Lepage, P., Nolte, A., Hellmig, S., Schreiber, S., and Ott, S.J. (2010). Transcriptional activity of the dominant gut mucosal microbiota in chronic inflammatory bowel disease patients. *Journal of Medical Microbiology* 59, 1114–1122.

Rescigno, M. (2009). Before They Were Gut Dendritic Cells. *Immunity* 31, 454–456.

Rescigno, M. (2015). Dendritic cell functions: Learning from microbial evasion strategies. *Seminars in Immunology* 27, 119–124.

Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., et al. (2013). Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. *Science (New York, N.Y.)* 341.

Ridlon, J.M., Kang, D.J., Hylemon, P.B., and Bajaj, J.S. (2014). Bile Acids and the Gut Microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology* 30, 332.

Rivera, J., Fierro, N.A., Olivera, A., and Suzuki, R. (2008). Chapter 3 New Insights on Mast Cell Activation via the High Affinity Receptor for IgE1. B.-A. in *Immunology*, ed. (Academic Press), pp. 85–120.

Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., et al. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits.

Robertson, M.D., Currie, J.M., Morgan, L.M., Jewell, D.P., and Frayn, K.N. (2003). Prior short-term consumption of resistant starch enhances postprandial insulin sensitivity in healthy subjects. *Diabetologia* 46, 659–665.

Rodrigues Hoffmann, A. (2017). The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals. *Vet Dermatol* 28, 60-e15.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847.

Rosen, E.D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2002). C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. *Genes & Development* 16, 22.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 313–323.

Ruderman, N., and Prentki, M. (2004). AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 340–351.

Sáez-Lara, M.J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., and Gil, A. (2015). The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed Res Int* 2015, 505878.

Sáez-Lara, M.J., Robles-Sanchez, C., Ruiz-Ojeda, F.J., Plaza-Diaz, J., and Gil, A. (2016). Effects of Probiotics and Synbiotics on Obesity, Insulin Resistance Syndrome, Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Human Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences* 17.

Sakurai, T. (1999). Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regulatory Peptides* 85, 25–30.

Salzman, N.H. (2010). Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: Détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* 1, 401.

Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., et al. (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature Immunology* 11, 76.

Sam, A.H., Troke, R.C., Tan, T.M., and Bewick, G.A. (2012). The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* 63, 46–56.

Sanchez, M., Darimont, C., Drapeau, V., Emady-Azar, S., Lepage, M., Rezzonico, E., Ngom-Bru, C., Berger, B., Philippe, L., Ammon-Zuffrey, C., et al. (2014). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *British Journal of Nutrition* *111*, 1507–1519.

Santaolalla, R., and Abreu, M.T. (2012). Innate immunity in the small intestine. *Current Opinion in Gastroenterology* *28*, 124.

Sartipy, P., and Loskutoff, D.J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 7265.

Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* *3*, 390–407.

Sartor, R.B. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* *134*, 577–594.

Sassi, F. (2010). L'obésité et l'économie de la prévention | OECD READ edition.

Sato, H., Genet, C., Strehle, A., Thomas, C., Lobstein, A., Wagner, A., Mioskowski, C., Auwerx, J., and Saladin, R. (2007). Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *362*, 793–798.

Sayin, S.I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., and Bäckhed, F. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* *17*, 225–235.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* *270*, 26746–26749.

Schlee, M., Harder, J., Köten, B., Stange, E.F., Wehkamp, J., and Fellermann, K. (2008). Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte  $\beta$ -defensin 2. *Clinical and Experimental Immunology* *151*, 528.

Schultz, M., Timmer, A., Herfarth, H.H., Sartor, R.B., Vanderhoof, J.A., and Rath, H.C. (2004). *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterology* *4*, 5.

Schwartz, S., Friedberg, I., Ivanov, I.V., Davidson, L.A., Goldsby, J.S., Dahl, D.B., Herman, D., Wang, M., Donovan, S.M., and Chapkin, R.S. (2012). A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response. *Genome Biology* *13*, r32.

Scrocchi, L.A., Brown, T.J., MaClusky, N., Brubaker, P.L., Auerbach, A.B., Joyner, A.L., and Drucker, D.J. (1996). Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat. Med.* *2*, 1254–1258.

Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., and Finlay, B.B. (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews* *90*, 859–904.

Seth, A., Yan, F., Polk, D.B., and Rao, R.K. (2008). Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G1060-1069.

Sharafedinov, K.K., Plotnikova, O.A., Alexeeva, R.I., Sentsova, T.B., Songisepp, E., Stsepetova, J., Smidt, I., and Mikelsaar, M. (2013). Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients - a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutrition Journal* 12, 138.

Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S.C., Goulet, J., and Tompkins, T.A. (2005). Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and Enteropathogenic *E. coli* O127:H6-Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements. *Infection and Immunity* 73, 5183.

Shibazaki, T., Tomae, M., Ishikawa-Takemura, Y., Fushimi, N., Itoh, F., Yamada, M., and Isaji, M. (2012). KGA-2727, a Novel Selective Inhibitor of a High-Affinity Sodium Glucose Cotransporter (SGLT1), Exhibits Antidiabetic Efficacy in Rodent Models. *J Pharmacol Exp Ther* 342, 288–296.

Shih, D.Q., and Targan, S.R. (2008). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 14, 390.

Shimomura, I., Hammer, R.E., Ikemoto, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401, 73–76.

Shin, J.-H., Nam, M.H., Lee, H., Lee, J.-S., Kim, H., Chung, M.-J., and Seo, J.-G. (2017). Amelioration of obesity-related characteristics by a probiotic formulation in a high-fat diet-induced obese rat model. *Eur J Nutr.*

Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., and Blankenstein, M. van (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 39, 690.

Silk, D.B.A., Davis, A., Vulevic, J., Tzortzis, G., and Gibson, G.R. (2009). Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 29, 508–518.

Smith, K., McCoy, K.D., and Macpherson, A.J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology* 19, 59–69.

Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2013). The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* 341.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota

analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16731.

Sood, A., Midha, V., Makharia, G.K., Ahuja, V., Singal, D., Goswami, P., and Tandon, R.K. (2009). The Probiotic Preparation, VSL#3 Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 7, 1202–1209.e1.

Spanhaak, S., Havenaar, R., and Schaafsma, G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 52, 899–907.

Spasova, D.S., and Surh, C.D. (2014). Blowing on Embers: Commensal Microbiota and Our Immune System. *Frontiers in Immunology* 5.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Santo, J.P.D., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells [mdash] a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology* 13, 145–149.

Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., Townsend, K.L., An, D., Nygaard, E.B., Hitchcox, K.M., Markan, K.R., Nakano, K., Hirshman, M.F., Tseng, Y.-H., et al. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 215.

Stecher, B. (2015). The Roles of Inflammation, Nutrient Availability and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. *Microbiology Spectrum* 3.

Steinert, R.E., Feinle-Bisset, C., Asarian, L., Horowitz, M., Beglinger, C., and Geary, N. (2017). Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3–36): Secretory Controls and Physiological Roles in Eating and Glycemia in Health, Obesity, and After RYGB. *Physiological Reviews* 97, 411–463.

Strober, W., Fuss, I., and Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation* 117, 514.

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.-J., Gibson, G.R., Collins, M.D., and Doré, J. (1999). Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4799.

Sun, M., He, C., Cong, Y., and Liu, Z. (2015). Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunology* 8, 969.

Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Engelhardt, H., Bengmark, S., Koch, S., Lochs, H., and Dörffel, Y. (2007). Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 56, 343–350.

Szebeni, B., Veres, G., Dezsöfi, A., Rusai, K., Vannay, Á., Mraz, M., Majorova, E., and Arató, A. (2008). Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clinical & Experimental Immunology* 151, 34–41.

Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* *17*, 1–14.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* *140*, 805–820.

Talham, G.L., Jiang, H.-Q., Bos, N.A., and Cebra, J.J. (1999). Segmented Filamentous Bacteria Are Potent Stimuli of a Physiologically Normal State of the Murine Gut Mucosal Immune System. *Infection and Immunity* *67*, 1992.

Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D.L.E., Nalin, R., et al. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology* *11*, 2574–2584.

Teixeira, T.F.S., Souza, N.C.S., Chiarello, P.G., Franceschini, S.C.C., Bressan, J., Ferreira, C.L.L.F., and Peluzio, M. do C.G. (2012). Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clinical Nutrition* *31*, 735–740.

The Lancet (2008). Probiotics or con? *The Lancet* *371*, 624.

Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Matak, C., Pruzanski, M., et al. (2009). TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab.* *10*, 167–177.

Thorens, B. (2009). GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection. *Molecular Membrane Biology*.

Tirone, T.A., and Brunnicardi, F.C. (2001). Overview of Glucose Regulation. *World J Surg* *25*, 461–467.

Trabelsi, M.-S., Daoudi, M., Prawitt, J., Ducastel, S., Touche, V., Sayin, S.I., Perino, A., Brighton, C.A., Sebti, Y., Kluza, J., et al. (2015). Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat Commun* *6*, 7629.

Tsai, A.G., Williamson, D.F., and Glick, H.A. (2011). Direct medical cost of overweight and obesity in the USA: a quantitative systematic review. *Obesity Reviews* *12*, 50–61.

Tso, P., Nauli, A., and Lo, C.-M. (2004). Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. *Biochemical Society Transactions* *32*, 75–78.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* *444*, 1027–1131.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C., Knight, R., and Gordon, J.I. (2007). The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* *449*, 804.

Tursi, A., Brandimarte, G., Giorgetti, G.M., Forti, G., Modeo, M.E., and Gigliobianco, A. (2004). Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Monit* *10*, 126–131.

Tursi, A., Brandimarte, G., Papa, A., Giglio, A., Elisei, W., Giorgetti, G.M., Forti, G., Morini, S., Hassan, C., Pistoia, M.A., et al. (2010). Treatment of Relapsing Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis With the Probiotic VSL#3 as Adjunctive to a Standard Pharmaceutical Treatment: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *The American Journal of Gastroenterology* 105, 2218.

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.-G., Jung, Y.-J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., et al. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature Immunology* 9, 769–776.

Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.-D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal Lamina Propria Dendritic Cell Subsets Have Different Origin and Functions. *Immunity* 31, 502–512.

Verberkmoes, N.C., Russell, A.L., Shah, M., Godzik, A., Rosenquist, M., Halfvarson, J., Lefsrud, M.G., Apajalahti, J., Tysk, C., Hettich, R.L., et al. (2009). Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *The ISME Journal* 3, 179–189.

Videla, S., Vilaseca, J., Antolín, M., García-Lafuente, A., Guarner, F., Crespo, E., Casalo, J., Salas, A., and Malagelada, J.R. (2001). Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *The American Journal of Gastroenterology* 96, 1486–1493.

Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R.S., Bartelsman, J.F.W.M., Dallinga-Thie, G.M., Ackermans, M.T., Serlie, M.J., Oozeer, R., et al. (2012). Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology* 143, 913–916.e7.

Walters, W.A., Xu, Z., and Knight, R. (2014). Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Letters* 588, 4223.

Wang, Y., and Kasper, L.H. (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain, Behavior, and Immunity* 38, 1.

Wang, H., Du, S., Zhai, F., and Popkin, B.M. (2006). Trends in the distribution of body mass index among Chinese adults, aged 20–45 years (1989–2000). *Int J Obes* 31, 272–278.

Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., and Liu, Y.-C. (2012). Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Dig Dis Sci* 57, 3126–3135.

Wang, Z.-K., Yang, Y.-S., Chen, Y., Yuan, J., Sun, G., and Peng, L.-H. (2014). Intestinal microbiota pathogenesis and fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20, 14805.

Way, J.M., Görgün, C.Z., Tong, Q., Uysal, K.T., Brown, K.K., Harrington, W.W., Oliver, W.R., Willson, T.M., Klierer, S.A., and Hotamisligil, G.S. (2001). Adipose Tissue Resistin Expression Is Severely Suppressed in Obesity and Stimulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Agonists. *J. Biol. Chem.* 276, 25651–25653.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., et al. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ -defensin expression. *Gut* 53, 1658.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., and Jr (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 112, 1796.

Williams, B.L., Hornig, M., Parekh, T., and Lipkin, W.I. (2012). 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* 3.

Withrow, D., and Alter, D.A. (2011). The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obesity Reviews* 12, 131–141.

Wong, J., de Souza, R., Kendall, C., Eman, A., and Jenkins, D. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. - PubMed - NCBI.

Woodard, G.A., Encarnacion, B., Downey, J.R., Peraza, J., Chong, K., Hernandez-Boussard, T., and Morton, J.M. (2009). Probiotics Improve Outcomes After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery: A Prospective Randomized Trial. *J Gastrointest Surg* 13, 1198–1204.

Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Förster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 519.

Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts, G.H., Morgan, D.G.A., Ghatei, M.A., et al. (2000). The Novel Hypothalamic Peptide Ghrelin Stimulates Food Intake and Growth Hormone Secretion. *Endocrinology* 141, 4325–4328.

Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Dhillo, W.S., Seal, L.J., Cohen, M.A., Batterham, R.L., Taheri, S., Stanley, S.A., Ghatei, M.A., et al. (2001a). Ghrelin Causes Hyperphagia and Obesity in Rats. *Diabetes* 50, 2540–2547.

Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2001b). Ghrelin Enhances Appetite and Increases Food Intake in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5992–5992.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 112, 1821.

Yadav, H., Lee, J.-H., Lloyd, J., Walter, P., and Rane, S.G. (2013). Beneficial Metabolic Effects of a Probiotic via Butyrate-induced GLP-1 Hormone Secretion. *J. Biol. Chem.* 288, 25088–25097.

Yamano, T., Iino, H., Takada, M., Blum, S., Rochat, F., and Fukushima, Y. (2006). Improvement of the human intestinal flora by ingestion of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. *British Journal of Nutrition* 95, 303–312.



Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., et al. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Medicine* 7, 941–946.

Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Whitehead, R., Washington, M.K., and Polk, D.B. (2007). Soluble Proteins Produced by Probiotic Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Survival and Growth. *Gastroenterology* 132, 562.

Zarrati, M., Shidfar, F., Nourijelyani, K., Mofid, V., Hossein zadeh-Attar, M.J., Bidad, K., Najafi, F., Gheflati, Z., Chamari, M., and Salehi, E. (2013a). *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium* BB12, and *Lactobacillus casei* DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *Biofactors* 39, 633–643.

Zarrati, M., Salehi, E., Mofid, V., Hossein Zadeh-Attar, M.J., Nourijelyani, K., Bidad, K., and Shidfar, F. (2013b). Relationship between probiotic consumption and IL-10 and IL-17 secreted by PBMCs in overweight and obese people. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 12, 404–406.

Zarrati, M., Salehi, E., Nourijelyani, K., Mofid, V., Zadeh, M.J.H., Najafi, F., Ghaflati, Z., Bidad, K., Chamari, M., Karimi, M., et al. (2014). Effects of probiotic yogurt on fat distribution and gene expression of proinflammatory factors in peripheral blood mononuclear cells in overweight and obese people with or without weight-loss diet. *J Am Coll Nutr* 33, 417–425.

Zhang, J., Xiao, X., Dong, Y., Xu, T., and Wu, F. (2016). Dietary supplementation with *Lactobacillus plantarum* dy-1 fermented barley suppresses body weight gain in high-fat diet-induced obese rats. *J. Sci. Food Agric.* 96, 4907–4917.

Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., and Neu, J. (2005). Alive and Dead *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. *J. Nutr.* 135, 1752–1756.

Zhang, X., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., Chen, Y., and Ji, L. (2013). Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS ONE* 8, e71108.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Peripheral CD4 T cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological Reviews* 238, 247.

Zocco, M.A., Verme, D., Zileri, L., Cremonini, F., Piscaglia, A.C., Nista, E.C., Candelli, M., Novi, M., Rigante, D., Cazzato, I.A., et al. (2006). Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 23, 1567–1574.

Zyrek, A.A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., and Schmidt, M.A. (2007). Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cellular Microbiology* 9, 804–816.