



HAL
open science

Modulation de la fonction de barrière intestinale et des jonctions serrées par les N-acyl homosérine lactones, molécules du quorum sensing bactérien

Doriane Aguanno

► **To cite this version:**

Doriane Aguanno. Modulation de la fonction de barrière intestinale et des jonctions serrées par les N-acyl homosérine lactones, molécules du quorum sensing bactérien. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT: 2020SORUS009 . tel-03148472

HAL Id: tel-03148472

<https://theses.hal.science/tel-03148472v1>

Submitted on 22 Feb 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.

SORBONNE UNIVERSITE

École doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

CENTRE DE RECHERCHE DES CORDELIERS - ÉQUIPE D'ARMELLE LETURQUE
'PHYSIOPATHOLOGIES INTESTINALES : NUTRITION ET FONCTION DE BARRIERE'

CENTRE DE RECHERCHE SAINT-ANTOINE - ÉQUIPE DE PHILIPPE SEKSIK & HARRY SOKOL
'MICROBIOTE, INTESTIN & INFLAMMATION'

THESE DE DOCTORAT DE PHYSIOLOGIE, PHYSIOPATHOLOGIE ET THERAPEUTIQUE

MODULATION DE LA FONCTION DE BARRIERE INTESTINALE ET DES JONCTIONS SERREES PAR LES N-ACYL HOMOSERINE LACTONES, MOLECULES DU *QUORUM SENSING* BACTERIEN

PRESENTEE PAR DORIANE AGUANNO

DIRIGEE PAR LE DOCTEUR SOPHIE THENET

Présentée et soutenue publiquement le 3 Juillet 2020

Devant un jury composé de :

Pr Joëlle Sobczak-Thépot
Dr Gaëlle Boudry
Dr Philippe Huber
Dr Frédérick Barreau
Pr Nicolas Barnich
Dr Sophie Thenet

Présidente du jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse



ABSTRACT

The intestine is home to the largest microbiota of the human body and therefore has to act as a selective barrier. The intestinal barrier function is impaired in various diseases including Inflammatory Bowel Disease (IBD). IBD result, in genetically susceptible subjects, from an overreaction of the intestinal immune system against the microbiota, whose dysbiosis is also a key feature. N-acyl homoserine lactones (AHLs) are small molecules involved in *quorum sensing*, a bacterial communication network, which can also mediate interactions with the host through an 'inter-kingdom' signalling. In a previous work, our team recently identified a new AHL, named 3-oxo-C12:2, which was shown to be the most abundant AHL within the human intestinal ecosystem but which was decreased in IBD subjects. The aim of my project was to investigate the effects of the 3-oxo-C12:2-AHL on the intestinal barrier function, and compare them to those of the structurally close 3-oxo-C12-AHL, which is produced by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* and which is known to impair epithelial barriers. In this study, I focused on the effects of these molecules on tight junctions (TJ) since they seal the paracellular space between intestinal epithelial cells and thus are major actors of the intestinal barrier.

In an *in vitro* study, human Caco-2/TC7 enterocytic cells were exposed to either 3-oxo-C12 AHL or 3-oxo-C12:2 AHL alone or under inflammatory conditions, recapitulated by exposure to the pro-inflammatory cytokines Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α , which are known to have deleterious effects on the barrier function. Our results showed opposite effects of the two AHLs, despite their close chemical structure. Indeed, while the 3-oxo-C12 AHL potentiated the hyperpermeability induced by the cytokines, the intestinal 3-oxo-C12:2 AHL attenuated the cytokine deleterious effects on TJ integrity. In particular, 3-oxo-C12:2 AHL protected the TJ proteins Occludin and Tricellulin, respectively, at bicellular and tricellular cell-cell contacts. 3-oxo-C12:2 AHL also maintained their interaction at the plasma membrane with their cytoplasmic partner ZO-1. Occludin and Tricellulin were shown to interact with the E3-ubiquitin ligase Itch and their increased ubiquitination caused by cytokines was suppressed in the presence of 3-oxo-C12:2, suggesting that this AHL prevents their endocytosis.

Our preliminary results obtained in mouse intestinal organoids showed that the 3-oxo-C12:2 AHL could attenuate the increase in epithelial cell death induced by the cytokine Interferon- γ . However, our *in vivo* investigations did not allow to conclude on the effects of the two AHLs on the intestinal barrier function in mice.

In conclusion, even though it is still to be highlighted *in vivo*, the putative beneficial role of the 3-oxo-C12:2 AHL, present in the human gut, on TJ and on the intestinal epithelial barrier function brings out new perspectives to better understand host-microbiota interactions in IBD.

KEY WORDS:

Intestinal barrier function; tight junctions; *quorum sensing*; N-acyl homoserine lactones; inflammatory bowel disease

RESUME

L'intestin héberge le microbiote le plus abondant du corps humain et exerce donc également une fonction de barrière. La barrière intestinale est perturbée dans différentes pathologies, en particulier dans les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Ces maladies mettent en jeu, chez des sujets génétiquement prédisposés, une réaction excessive du système immunitaire intestinal envers le microbiote, dont la composition est déséquilibrée (dysbiose). Les N-acyl homosérine lactones (AHLs) sont des molécules du *quorum sensing*, un système bactérien de communication, et interagissent également avec les cellules de l'hôte, dans un dialogue dit "inter-règne". Notre équipe a récemment identifié l'AHL 3-oxo-C12:2, une forme jamais décrite, comme majoritaire dans l'écosystème intestinal humain et a montré qu'elle est diminuée dans les MICI. L'objectif de ma thèse a été d'étudier l'impact de cette nouvelle AHL sur la fonction de barrière intestinale et de le comparer à celui de l'AHL 3-oxo-C12, qui est produite par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* et connue pour ses effets délétères sur les barrières épithéliales. Je me suis particulièrement intéressée aux jonctions serrées, qui en contrôlant la perméabilité paracellulaire des cellules épithéliales, constituent un acteur majeur de cette fonction de barrière.

Nous avons utilisé dans un premier temps un modèle *in vitro* de cellules épithéliales intestinales humaines différenciées, la lignée Caco-2/TC7. Les effets des deux AHLs sur la perméabilité paracellulaire et sur l'organisation des jonctions serrées ont été analysés à l'état basal ou en présence de deux cytokines pro-inflammatoires, l'Interféron- γ et le Tumor Necrosis Factor- α , connues pour altérer la fonction de barrière. Nos résultats ont mis en évidence des effets opposés des deux AHLs malgré l'analogie de leurs structures chimiques. L'AHL 3-oxo-C12 de *P. aeruginosa* potentialise l'augmentation de la perméabilité induite par les cytokines. Inversement, la 3-oxo-C12:2, présente naturellement dans l'intestin, protège contre les effets délétères des cytokines sur l'organisation des jonctions serrées. En particulier, elle permet le maintien, respectivement aux jonctions bicellulaires et tricellulaires, de l'occludine et de la tricelluline, ainsi que leur interaction avec leur partenaire cytoplasmique ZO-1. L'occludine et la tricelluline interagissent avec l'E3-Ubiquitine Ligase Itch et l'augmentation de l'ubiquitination des protéines de jonctions serrées causée par les cytokines est atténuée par la 3-oxo-C12:2, suggérant que cette AHL prévient leur endocytose.

Nos données préliminaires obtenues dans un modèle d'organoïdes intestinaux murins montrent que l'AHL la 3-oxo-C12:2 atténue l'augmentation de la mort cellulaire des cellules épithéliales induite par l'Interféron- γ . Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effets des AHLs sur la barrière intestinale *in vivo* dans un modèle de colite inflammatoire chez la souris.

En conclusion, même s'ils restent à démontrer *in vivo*, les effets potentiellement protecteurs de l'AHL 3-oxo-C12:2 sur les jonctions serrées et sur la barrière épithéliale de l'intestin constituent une piste totalement nouvelle pour mieux comprendre les interactions hôte-microbiote mises en jeu dans les MICI.

MOTS CLES :

Fonction de barrière intestinale ; jonctions serrées ; *quorum sensing* ; N-acyl homosérine lactones ; maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci aux rapporteurs Gaëlle Boudry et Philippe Huber, aux examinateurs Nicolas Barnich et Frédéric Barreau et à la présidente du jury Joëlle Sobczak Thepot pour votre disponibilité. J'aimerais particulièrement remercier Frédéric Barreau, comme expert scientifique de mon suivi de thèse, pour ses réponses à mes nombreuses questions et ses remarques et conseils si pertinents tout au long de mon doctorat. Ils auront été d'une grande aide.

S'il y a bien une personne sans qui rien de cela n'aurait été possible, c'est ma directrice de thèse Sophie Thenet. Un immense merci pour m'avoir donné ta confiance et osé choisir ce pari risqué, après seulement quelques minutes d'entretien et en connaissant si peu de moi (tu ne ferais pas long feu au poker ...). Je crois que cette expérience de plus de trois ans nous aura prouvé qu'on a eu raison ! Je n'aurais pas pu imaginer une si bonne entente, qu'elle soit scientifique ou humaine. Merci pour ton encadrement si juste et subtil, qui m'a toujours laissé une grande part de liberté et d'expression tout en me guidant dans la bonne direction. J'ai le sentiment que l'on a réellement travaillé main dans la main au cours de ce projet. Merci également pour ces opportunités d'expériences d'enseignements, auxquelles je n'aurais certainement jamais pensé toute seule ! Nos liens ne seront pas que scientifiques, c'est indéniable, et je m'estime très chanceuse d'avoir pu partager ta route. Je profite donc ici aussi pour remercier sincèrement Jérôme de son accueil si chaleureux et tous ces moments waxés au château, ceux-ci resteront d'excellents souvenirs ! Je crois que je ne suis pas toujours facile (et souvent têtue) mais tu as toujours su extraire (et me montrer) le meilleur de moi. Pour tout cela, tu as ma gratitude éternelle.

J'aimerais remercier chaleureusement l'unique et exceptionnelle VéroC ! Tu es devenue, malgré toi, directrice de thèse suppléante quand Sophie était absente ! Un immense merci pour ta disponibilité infinie, tes nombreux conseils scientifiques, techniques, philosophiques, informatiques, administratifs (pour la rime) et j'en oublie. Ton champ d'expertise s'est étendu de la culture, à la bio mol et qPCR, en passant par les encombrants et la mutuelle étudiante. Tu as également supporté (en silence et toujours avec bienveillance) mon voisinage immédiat pendant plus de trois ans (puis avec l'aide de Barbie puis de Camille !) : désolée pour tous mes soupirs, mes moments de ménage compulsif, mes jurons, mes aller-retours en courant ... Ton calme est infailible (sauf quand tu as soif) : *"T'inquiètes tu gères"* ! Barbie, Sara et moi avons toujours été d'accord que le fait que Sophie et toi partagez une humanité rare, merci à vous deux (quelle équipe de choc), de m'en avoir fait bénéficier.

Un immense merci à Garance/Gagou : tu es une perle rare ! Tout a commencé à marcher avec toi à mes côtés et quel plaisir de t'avoir retrouvé plus tard. Merci pour ton travail dans ce projet et pour ton aide et ton accueil côté rive droite, tu as été un vrai guide. Ta vivacité, ton esprit, ton autonomie et ta gentillesse font de toi quelqu'un d'exceptionnel. Je suis ravie de pouvoir te voir évoluer au fil des années et je n'ai aucun doute sur ton avenir : quelle que soit la figurine Lego de ton choix (tu crois qu'ils ont l'accessoire machine à coudre ?), ta route sera PAILL-ÉT-ÉE (et fluffy comme Kiitos). Tu es un rayon de soleil pour tout le monde au quotidien, sache-le (qui passe aux larmes en un clignement d'œil, à quand l'arc-en-ciel ?) !

Un grand merci à Philippe (ladies first, désolée) pour ta confiance en Sophie et moi dans ce projet. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, ton avis franc aussi (et pour nous avoir apporté Garance sur un plateau d'argent !) et surtout ton humanité. Aucun de nous n'avait certainement

REMERCIEMENTS

imaginé il y a quelques années que ces quelques expériences deviendraient mon sujet complet, je ne suis pas déçue du voyage !

Un grand merci à toute la première équipe des Cordeliers : Armelle pour ton accueil, je n'oublierai jamais cette phrase que tu m'as dite lors de notre première rencontre (quelque-chose comme "si tu montres de l'investissement, on te le rendra", ça a plutôt bien marché je crois) ; merci à toute la team Sara-Barbara-VéroC SBV, pour votre aide à mes débuts dans le labo (et après aussi !) ; merci à Céline pour ton accueil (si spécifique à toi...) de ton labo, tes milliards de conseils techniques en tout, ton aide et ta participation bien sûr dans ce projet ; merci à Marielle pour ton temps et ton aide si précieux (entre autres) pour le Wes, bijou de technologie, j'ai beaucoup appris à tes côtés ; merci à Hédi *aka* Professeur Soula pour tes conseils, ton enthousiasme à modéliser tout et n'importe quoi ; merci à tous les jeunes du labo Sami, Léa, Ingrid et un merci particulier à Atoussa, avec qui on a partagé de bons moments à la paillasse, des bons crumbles et désormais de nombreux cocktails (et des Skypes en ce moment !) ; merci aux "adultes" du labo que je n'ai pas encore cités ici : Marie bien sûr, pour ta chaleur et tes acras ; Nana et Michèle, pour qui j'ai toujours une pensée coupable en prenant une plus grande assiette ; Sylvie, pour ta rhubarbe et tes échanges ; Agnès et Patricia, yoginis assidues ; Carine, pour ton expertise qui s'étend du tirage des cartes du tarot à la Tricelluline de la peau ; et Alexandra, avec qui je partage de nombreux points communs (pas les meilleurs je le crains). Travailler avec vous toutes (et les rares garçons) a toujours été un plaisir et la bonne ambiance, à laquelle on a tous contribué, rend la vie plus douce !

Un autre grand merci à l'équipe de Saint-Antoine : merci à Elodie, Émilie, Sara, Thibaut, Morgane, Sothéa, Olivier, Cyriane, Manon (ton moral d'acier est une leçon pour tous), les nouvelles recrues Camille, Gabrielle, Lorenzo, et enfin et surtout Loïc pour ton accueil et ton aide indispensable au quotidien ! Merci à Dominique et Lydie pour vos conseils dans tous les projets AHLs. A Jean-Pierre, mon tuteur pédagogique et à Luisa : merci à tous les deux pour votre disponibilité et vos très nombreux conseils avisés tout au long de ce projet. Thank you to Aonghus for helping me with R and for our numerous talks about sourdough!

Un merci particulier à Margaux pour ton aide précieuse et pour avoir étendu le binôme STDA à un trinôme STDAMW ! Ton temps, ton enthousiasme et tes idées ont été d'une grande aide particulièrement l'année passée, je t'en remercie sincèrement.

Merci à Nathalie pour ton aide dans tant de choses du quotidien. Ta présence au labo est inestimable, je pense pouvoir le dire au nom de tout le monde. Merci pour tous nos échanges, à Paris intra-muros, de l'autre côté de l'Atlantique ou d'un côté à l'autre de la France et qu'il s'agisse d'*E. coli* ou de pâtisserie ! Telle la fève dans la galette des Rois à la noisette de Yann Couvreur, tu es rare et on est toujours content d'avoir la chance de tomber dessus !

Un grand merci à Marjo et Ingrid pour m'avoir transmis votre savoir sur les organoïdes (après avoir optimisé tout ça dans le(s) labo(s)) et pour tous vos conseils. Ingrid, ta persévérance, ta force et ton sourire à toute épreuve sont un exemple pour nous tous.

Merci à chacun/chacune pour les très nombreux moments conviviaux que l'on passe tous ensemble et qui manquent cruellement en cette période de confinement lors de laquelle j'écris ces pages !

Agathe, merci sincèrement pour tous tes conseils avisés de chimiste (ainsi qu'à Jean-Maurice Mallet) pendant ces années, pour ton travail qui a répondu à tant de nos questions et pour la reproduction de tes précieuses données.

Merci à Florian pour notre travail ensemble à l'INRA, et ton temps très précieux, dans ces expériences de plusieurs semaines qui nécessitaient une attention et une présence quotidienne. Les journées passées à l'INRA ont toujours été un plaisir pour nous toutes !

REMERCIEMENTS

Merci à toute l'équipe de l'animalerie du CRSA pour votre temps et vos conseils dans les expériences *in vivo*.

Merci à Magali Svreck et son équipe pour votre aide et le temps consacré à l'analyse des lames de patients et m'avoir appris à faire un score histologique.

Merci à Stéphane pour ton accueil à l'institut de la vision et ton aide dans ma première expérience de microscopie confocale.

Un immense immense merci à Daniel pour tous tes conseils d'analyses d'images mais surtout pour m'avoir tant appris (puis permise de t'assister en cours !). J'ai réellement l'impression d'avoir acquis de nouvelles compétences et je dois bien admettre que je me suis bien amusée aussi, malgré tous les soupirs poussés quand ma macro Fiji ou mon script R ne fonctionnaient pas ! Merci pour tout.

Merci à Sébastien pour tes conseils "Ubi-News" et à toi et à l'équipe pour m'avoir énormément appris lors de mon stage, il y a tant de petites (et grandes) choses qui me sont utiles au quotidien, j'espère que nos routes continueront de se croiser !

(Re-)merci à Sophie (of course!), VéroC, Luisa, Philippe, Céline et Garance pour vos corrections et commentaires dans la relecture de mon manuscrit de thèse.

(Re-)merci aux Dior Girlzzz Carine & Marielle pour (i) sponsoriser nos doctorats par Dior Make-up, (ii) nous faire profiter de certains avantages (au hasard, le Wes ...), (iii) et de m'avoir laissé squatter votre bureau chicissime et si calme pour la rédaction de ma thèse (quand on avait encore le droit d'aller au travail), ta chaise me manque Carine ...

Sur le plan (beaucoup) moins professionnel : Marielle (jamais deux sans trois), merci pour tous les excellents moments passés au labo, en auberge de jeunesse chez toi (sans toi ET avec toi), chez moi (et pour tous ces petit-déjs mérités ou pas). Une énorme merci aux *badass randonneuses* Barbie et Céline, Garance et la nouvelle recrue Ingrid pour ces moments d'escapades rando-plage (voire açaiiii) ou rando-raclette ! Je sais que vous m'avez détestée (en débardeur ou en raquettes ou même en baudrier) sur ces derniers mètres de dénivelé mais une fois en haut : on était HYPER contentes ! J'espère qu'il y en aura d'autres pour que Garance rit/pleure/rit, qu'Ingrid se dépasse l'air de rien, que Barbie mange des mûres et framboises en faisant des panoramiques ratés et que Céline continue de montrer ses genoux ! Et bien sûr à notamment Sophie, Jérôme & Barnabé, Véro, Carine, Marielle et les filles pour les colos Plaisir-Grignon, qu'on a hâte de réitérer dans le monde d'après !

Bien évidemment merci à tous mes proches et amis : Anna & Juan, pour être, chacun à votre façon, toujours présents depuis tant d'années, Aurélie pour ton aura positive et apaisante (et tout le reste), Morgane pour les heures passées à m'écouter, Martin pour la compagnie sur les bancs du lycée et de la fac, Mateja for being my first labmate. Merci à Judith, Lori et Martine pour être des familles d'adoption depuis toujours. Martine et Jean-Baptiste, merci de m'avoir permis de travailler à vos côtés, j'y ai beaucoup appris et ces compétences m'ont été utiles partout où je suis passée !

Et enfin à toute ma famille, merci de votre soutien : Adeline pour avoir fait en sorte que je puisse finir d'écrire ma thèse dans le meilleur des confinements possibles, Jacques, mamie et surtout merci à mes deux parents pour votre appui pendant toutes ces années d'études que tout le monde n'a pas la chance de pouvoir faire et qui n'auraient pas été possibles sans votre soutien à tous les deux !

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
INTRODUCTION	1
I. ORGANISATION DE L'INTESTIN & FONCTION DE BARRIERE INTESTINALE	2
A. ARCHITECTURE ET ORGANISATION DE L'INTESTIN	2
i. Structure macroscopique du tube digestif	2
ii. Organisation tissulaire et cellulaire de l'intestin	4
iii. Les différentes fonctions de l'intestin	6
iv. Le microbiote intestinal et sa contribution au fonctions intestinales	7
B. FONCTION DE BARRIERE INTESTINALE	9
i. Barrière écologique	9
ii. Barrières biochimique et immunologique	11
a. Peptides antimicrobiens	11
b. Immunité et <i>Gut-Associated-Lymphoid-Tissue</i> (GALT)	14
iii. Barrière physique	15
a. Rôle du mucus	16
b. Les jonctions intercellulaires	18
iv. Perméabilité sélective et organisation moléculaire des jonctions serrées	20
a. Les différentes voies de passage	20
b. Structure moléculaire des jonctions serrées	22
c. Dynamique et régulation des jonctions serrées	26
v. Pathologies humaines, barrière intestinale et jonctions intercellulaires	29
a. Jonctions intercellulaires et agents infectieux	29
b. Jonctions serrées et mutations héréditaires	30
c. Perméabilité intestinale, jonctions serrées et pathologies humaines	31
II. DEFAUT DE BARRIERE & PHYSIOPATHOLOGIES INTESTINALES : LES MICI	33
A. PRESENTATION GENERALE ET EPIDEMIOLOGIE DES MICI	33
B. ÉTIOLOGIE DES MICI	35
i. Facteurs génétiques	35
ii. Facteurs environnementaux	38
iii. Perturbation de la fonction de barrière dans les MICI	39
a. Modifications de la barrière biochimique dans les MICI	39
b. Modifications de la couche de mucus dans les MICI	40
c. <i>Leaky gut</i> : Perméabilité et jonctions serrées dans les MICI	42
d. Modèles murins de défaut de barrière	46
iv. La dysbiose du microbiote intestinal dans les MICI	49
a. Composition du microbiote intestinal humain	49
b. Caractéristiques de la dysbiose dans les MICI	52

III. QUORUM SENSING & INTESTIN	57
A. PRESENTATION GENERALE DU <i>QUORUM SENSING</i>	57
i. Principes et mécanismes du <i>quorum sensing</i>	57
ii. Les différents systèmes de <i>quorum sensing</i>	58
a. <i>Quorum sensing</i> des bactéries Gram-positives.....	58
b. <i>Quorum sensing</i> des bactéries Gram-négatives.....	59
c. <i>Quorum sensing</i> inter-espèce : AI-2.....	63
B. DIALOGUE INTER-REGNE : EFFETS DES AHLs SUR LE CELLULES EUCARYOTES	64
i. Effets immunomodulateurs.....	65
ii. Effets sur la viabilité cellulaire.....	66
iii. Effets sur la fonction de barrière épithéliale.....	69
iv. Récepteurs de l'AHL 3-oxo-C12 dans les cellules hôtes.....	70
v. Dialogue de l'hôte vers la bactérie.....	71
C. MISE EN EVIDENCE DU <i>QUORUM SENSING</i> DANS L'INTESTIN.....	72
i. État de l'art de la littérature.....	72
ii. Mise en évidence des AHLs dans l'intestin humain et identification d'une nouvelle forme, l'AHL 3-oxo-C12:2, diminuée dans les MICI	74
OBJECTIFS	77
RESULTATS	78
I. ÉTUDE <i>IN VITRO</i> DES EFFETS DES AHLs SUR LA FONCTION DE BARRIÈRE EPITHELIALE	80
A. ARTICLE PRINCIPAL : <i>PROTECTIVE ROLE OF THE 3-OXO-C12:2 ACYL HOMOSERINE LACTONE, A QUORUM SENSING MOLECULE FROM THE GUT MICROBIOTA, ON TIGHT JUNCTION INTEGRITY UNDER INFLAMMATORY CONDITIONS</i>	81
B. EFFETS DES AHLs SUR LA BARRIÈRE EPITHELIALE ANALYSES DANS LA LIGNEE ENTEROCYTAIRE CACO-2/TC7 : RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	115
i. Comparaison de différentes doses d'AHLs.....	115
ii. Études de différents stimuli modulateurs de la fonction de barrière.....	117
iii. Impact de la mort cellulaire et de l'extrusion sur la perméabilité paracellulaire.....	118
iv. Implication de la voie de régulation des jonctions serrées par la MLCK.....	120
v. Expression de cytokines pro-inflammatoires.....	121
C. EFFETS <i>IN VITRO</i> DES AHLs SUR LA BARRIÈRE EPITHELIALE DANS UN MODELE D'ORGANOÏDES MURINS	123

II. ÉTUDE <i>IN VIVO</i> DES EFFETS DES AHLs SUR LA FONCTION DE BARRIÈRE	
INTESTINALE	126
A. EFFETS DES AHLs A SUR LA FONCTION DE BARRIÈRE INTESTINALE DANS UN	
MODELE DE COLITE INFLAMMATOIRE CHEZ LA SOURIS	126
B. EFFETS A COURT-TERME DES AHLs SUR LA FONCTION DE BARRIÈRE	
INTESTINALE	131
DISCUSSION & PERSPECTIVES	133
I. STRATEGIE L'ÉTUDE DU RÔLE DES AHLs SUR LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE &	
MECANISMES IMPLIQUÉS	134
II. STABILITÉ & ENDOCYTOSE DES JONCTIONS SERRÉES	139
III. BARRIÈRE INTESTINALE, RÉPARATION & INFLAMMATION	142
IV. AHLs, MICROBIOME, MÉTABOLITES BACTÉRIENS & BARRIÈRE	
INTESTINALE	146
CONCLUSION	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
ANNEXES	181
ARTICLE ANNEXE EN 2^E AUTEUR : GENSER ET AL., 2018	
REVUE EN 3^E AUTEUR : LE GALL ET AL., 2018	
ARTICLE ANNEXE EN 3^E AUTEUR : POSTAL ET AL., 2020	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

16HBE	16 Human Bronchial Epithelial
2HQ	2-HydroxyQuinoline
3-oxo-C12-HSL	N-3-oxododecanoyl-homoserine lactone
3-oxo-C6-HSL	N-3-oxohexanoyl-homoserine lactone
Å	Ångstrom
Acyl-ACP	Acyl-Acyl Carrier Protein
AGCC	Acides Gras à Chaîne Courte
Agr2	Anterior Gradient Homolog 2
AHLs	Acyl-Homosérine Lactones
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
AI-1/-2/3	AutoInducer-1/-2/3 (molécule auto-inductrice-1/-2/-3)
AIEC	Adherent-Invasive Escherichia coli
AIP	AutoInducer Peptide
AMP	AntiMicrobial Peptides (Peptides AntiMicrobiens)
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
APC	Antigen-Presenting Cells (Cellules présentatrices d'Antigènes)
B _{reg} cells	Cellules B régulatrices
BVES	Blood Vessel Epicardial Substance
C4-HSL	N-butanoyl-homoserine lactone
CA-MLCK	MLCK Constitutivement Active
CAI	Cholera AutoInducer
CARD9	CAspase Recruitment Domain-containing protein
CD	Crohn's Disease (Maladie de Crohn)
CD-36	Cluster of Differentiation-36
CDC42	Cell Division Cycle 42
CDCA	Acide ChénoDésoxyDholique
Cellules NK	Cellules Natural Killer
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CLCA1	Calcium-Activated Chloride Channel regulator 1
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1
DCA	Acide DésoxyCholique
DSS	Dextran Sulfate de Sodium
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (Acide Ethylène Glycol Tétra-acétique)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPEC	Entéropathogène <i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmic Reticulum (Réticulum Endoplasmique)
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
Fcgbp	Fcg-binding protein
FD4	FTTC-Dextran 4 kDa
GIP	Gastric Inhibitory Peptide
GLP-1	Glucagon Like Peptide-1
GLP-2	Glucagon Like Peptide-2
GLUT	GLUcose Transporter
GPCR	G-Protein Coupled Receptor (Récepteur Couplé aux Protéines G)
Gram-	Bactérie Gram-négative
Gram+	Bactérie Gram-positif

LISTE DES ABREVIATIONS

GWAS	Genome Wide Studies
HBD-1	Human Beta Defensin-1
HBD-2	Human Beta Defensin-2
HBD-3	Human Beta Defensin-3
HD-5	Human Defensin-5
HD-6	Human Defensin-6
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IEL	Intra-Epithelial Lymphocytes (lymphocytes intra-épithéliaux)
IFN γ	Interféron- γ
IgA	Immunoglobulin A (Immunoglobuline A sécrétoires)
IL	Interleukine
IL13R α 1	Interleukin-13 Receptor α 1 (Récepteur à l'Interleukine-13 α 1)
IL13R α 2	Interleukin-13 Receptor α 2 (Récepteur à l'Interleukine-13 α 2)
IQGAP1	IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1
IQS	Integrated Quorum Sensing
JAMs	Junctional Adhesion Molecule
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCA	Acide LitoCholique
lincRNA	Long Intergenic Noncoding RiboNucleic Acid (Large Acide RiboNucléique non codant intergéniques)
LPS	Lipolysaccharide
LSRs	Lipolysis-Stimulated lipoprotein Receptors
MAGI	Membrane-Associated Guanylate kinase Inverted
MAGUK	Membrane-Associated Guanylate Kinase
MAMPs	Microbial Associated Molecular Patterns
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
mBD-3	mouse Beta Defensin-3
MC	Maladie de Crohn
MDCK	Madin-Darby Kidney Cells
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
miRNA	micro RiboNucleic Acid (micro Acide RiboNucléique)
MMP-2/-3	Matrix MetalloProteinase-2/-3 (Métalloprotéinase Matricielle-2/-3)
MPO	MyéloPerOxidase
MPP PA	Micelles PostPrandiales d'Acide Palmitique
MUC2	Mucin 2 (Mucine 2)
ncRNA	non coding RiboNucleic Acid (Acide RiboNucléique non codant)
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PATJ	PALS1-Associated Tight Junction
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cell (cellules mononuclées du sang périphérique)
PDZ	Post-synaptic density 95/Drosophila disc large/Zona-occludens 1
PEPT1	PEptide Transporter 1
PGN	Peptidoglycane
PKC	Protéine Kinase C
PLC	PhosphoLipase C
PMNs	PolyMorphonuclear Neutrophils (Neutrophiles PolyMorphonucléaires)
PON-1/-2/-3	Paraoxonase-1/-2/-3
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ

LISTE DES ABREVIATIONS

PQS	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal
PrP ^c	Cellular Prion Protein (Protéine cellulaire du Prion)
PRR	Pattern Recognition Receptor
PYY	Peptide tyrosine tyrosine
QS	Quorum Sensing
R-THMF	(2R,4S)-2-methyl-2,3,3',4-tetrahydroxytetrahydrofurane
RAC	RAs-related C3 botulinum toxin substrate
RCH	Rectocolite hémorragique
RegIII- α	Regenerating islet-derived protein 3- α
RegIII- β	Regenerating islet-derived protein 3- β
RegIII- γ	Regenerating islet-derived protein 3- γ
RELM β	Resistin-Like Molecule- β
RHOGEF	Rho Guanine Exchange Factor
ROCK	RhO AssoCiated protein Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species (Espèce Réactives de l'Oxygène)
S-THMF-borate	(2S,4S)-2-methyl-2,3,3',4-tetrahydroxy-tetrahydrofurane-borate
SCFA	Short Chain Fatty Acids (Acides Gras à Chaîne Courte)
SGLT1	Sodium-Glucose-Linked-Transporter
SH3	Src Homologous 3
SHIME [®]	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
sIgA	secretory Immunoglobulin A (Immunoglobuline A sécrétoires)
SNP	Single Nucleotide Polymorphim
SR-B1	Scavenger Receptor class B-Type 1
TAMPs	Tight junction Associated MARVEL Proteins (protéines à domaines MARVEL associées aux jonctions serrées)
TEER	TransEpithelial Electric Resistance (Résistance Electrique TransEpithéliale)
TFF3	TreFoil Factor 3
TGF β	Transforming Growth Factor β
T _H 1/2/3/17	(Lymphocytes) T-Helper 1/2/3/17
TJs	Tight Junctions (jonctions serrées)
TK	Tyrosine Kinase
TM	TransMembranaire
TNBS	TriNitroBenzene Sulfonic Acid (acide Sulfonique TriNitroBenzene)
TNF α	Tumor Necrosis Factor- α
T _{reg}	Lymphocytes T régulateurs
UC	Ulcerative Colitis (Rectocolite hémorragique)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
vs.	<i>versus</i>
YAP	Yes-Associated Protein
Zg16	Zymogen Granule Protein 16
ZO-1/-2/-3	Zonula Occludens-1/-2/-3
ZONAB	ZO-1-associated Nucleic Acid Binding protein 1

LISTE DES FIGURES DE L'INTRODUCTION

FIGURE 1 : Architecture et organisation histologique de l'appareil digestif	3
FIGURE 2 : Spécificités cellulaires de l'intestin grêle et du colon	5
FIGURE 3 : Répartition du microbiote intestinal et sa contribution aux fonctions intestinales	8
FIGURE 4 : Mécanismes de défenses de la muqueuse intestinale	13
FIGURE 5 : Organisation de la couche de mucus dans l'intestin grêle et le colon	17
FIGURE 6 : Le complexe apical jonctionnel	19
FIGURE 7 : Perméabilité paracellulaire et composition des jonctions serrées	21
FIGURE 8 : Tricelluline et jonctions serrées tricellulaires	24
FIGURE 9 : Domaines d'interactions protéine-protéine de la famille des protéines adaptatrices de la plaque cytosolique Zonula Occludens ZO-1, ZO-2 et ZO-3	25
FIGURE 10 : Régulation des jonctions serrées et altération de la barrière épithéliale intestinale	28
FIGURE 11 : Comparaison des phénotypes des MICI	34
FIGURE 12 : Prédipositions génétiques des MICI	37
FIGURE 13 : Illustration des défauts de la barrière chimique et physique dans les MICI	41
FIGURE 14 : Physiopathologie séquentielle des MICI	48
FIGURE 15 : Le microbiote intestinal humain	51
FIGURE 16 : La dysbiose dans les MICI	55
FIGURE 17 : Principe du quorum sensing	58
FIGURE 18 : Le Quorum Sensing (QS) de type AI-1	62
FIGURE 19 : Identification d'AHLs dans l'écosystème intestinal, dont une AHL prédominante, la 3-oxo-C12:2, diminuée dans les MICI	75

LISTE DES FIGURES DES RESULTATS

FIGURE 20 : Perméabilité paracellulaire aux macromolécules mesurée dans la lignée Caco-2/TC7 en réponse à différentes doses d'AHL en situation basale ou inflammatoire	115
FIGURE 21 : Analyse des protéines de jonctions serrées dans les cellules Caco-2/TC7 en réponse à différentes doses des AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 en situation basale ou inflammatoire ..	116
FIGURE 22 : Impact des AHLs sur différents stimuli déstabilisateurs de la barrière épithéliale dans la lignée Caco-2/TC7	118
FIGURE 23 : Effets de l'inhibiteur pan-caspase ZVAD-FMK ou de l'inhibiteur de ROCK Y-27632 sur la réponse aux AHLs 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 en situation basale ou inflammatoire ..	119
FIGURE 24 : Expression de la MLCK en réponse aux AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 en situation basale ou inflammatoire	121

FIGURE 25 : Expression de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 en situation basale ou inflammatoire	122
FIGURE 26 : Analyse de l'apoptose dans les organoïdes intestinaux murins en réponse à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 seule ou en combinaison avec la cytokine IFNγ	124
FIGURE 27 : Colite inflammatoire induite au DSS (2.5%) chez la souris après 24 jours d'exposition à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2	127
FIGURE 28 : Colite inflammatoire induite au DSS (1.5%) chez la souris après 18 jours d'exposition à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2	129
FIGURE 29 : Colite inflammatoire induite au DSS (1.5%) chez la souris après 22 jours d'exposition à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2	130
FIGURE 30 : Perméabilité intestinale mesurée <i>ex vivo</i> après 2 jours de gavages intra-gastriques à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2	132

LISTE DES TABLEAUX DE L'INTRODUCTION

TABEAU 1 : Incidence et prévalence de la Maladie de Crohn et RectoColite Hémorragique	33
TABEAU 2 : Vue d'ensemble des modifications des Défensines dans les MICI	40
TABEAU 3 : Vue d'ensemble des modifications des protéines de jonctions intercellulaires et augmentation de perméabilité dans les MICI	45
TABEAU 4 : Caractéristiques de la dysbiose bactérienne, fongique et virale dans les MICI	53
TABEAU 5 : Vue d'ensemble de molécules auto-inductrices du quorum sensing bactérien et des systèmes correspondants dans quelques exemples de bactéries	60
TABEAU 6 : Vue d'ensemble des effets de l'AHL 3-oxo-C12 sur les cellules eucaryotes, dans différents types cellulaires, sur des paramètres inflammatoires, sur la viabilité cellulaire et sur la fonction de barrière épithéliale	67-68

INTRODUCTION

I. ORGANISATION DE L'INTESTIN & FONCTION DE BARRIERE INTESTINALE

A. ARCHITECTURE ET ORGANISATION DE L'INTESTIN

i. Structure macroscopique du tube digestif

Le tractus digestif, qui s'étend de la cavité buccale au rectum, est l'organe permettant la prise d'aliments, leur digestion, l'absorption de nutriments et la déjection des produits non absorbés. Ces étapes de la digestion alimentaire sont assurées par les différents segments du tube digestif (Figure 1A) : la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le colon, le rectum et l'anus. L'appareil digestif est étroitement lié à d'autres organes comme les glandes salivaires, la vésicule biliaire, le foie, le pancréas, qui participent à la fonction de digestion (Figure 1A).

L'intestin grêle (5m environ chez l'Homme), permettant l'absorption de nutriments et qui commence au pylore à la sortie de l'estomac, est composé du **duodénum** puis du **jéjunum** et de **l'iléon**, se terminant à la jonction iléo-caecale (Figure 1B). Après le caecum, le **colon** (long d'1.5m environ chez l'Homme), dans lequel les selles sont formées, débute par le segment **ascendant** (ou colon droit) puis le colon **transverse**. Le colon **descendant** ou gauche est relié au rectum par le colon sigmoïde. Le tube digestif se termine par l'**anus** (Figure 1B).

La paroi de l'intestin grêle (2.5cm de diamètre chez l'Homme) et du colon (4-5cm de diamètre chez l'Homme) est composée de différentes tuniques en couches concentriques (de la plus externe à la plus interne) : la tunique externe, une couche externe de muscle longitudinaux puis une couche interne de muscles circulaires assurant le péristaltisme nécessaire à la motilité intestinale, une sous-muqueuse et la muqueuse (Figure 1C). La **muqueuse** est composée d'une couche de musculaire-muqueuse et de la *lamina propria* (ou chorion) sur laquelle repose une lame basale et l'**épithélium intestinal**. La *lamina propria* est un tissu conjonctif qui héberge les cellules immunitaires intestinales et les vaisseaux lymphatiques et sanguins.

L'**épithélium intestinal**, qui est en contact direct avec la lumière du tube digestif, est un épithélium prismatique simple constitué de différents types de cellules épithéliales différenciées, détaillés plus bas.

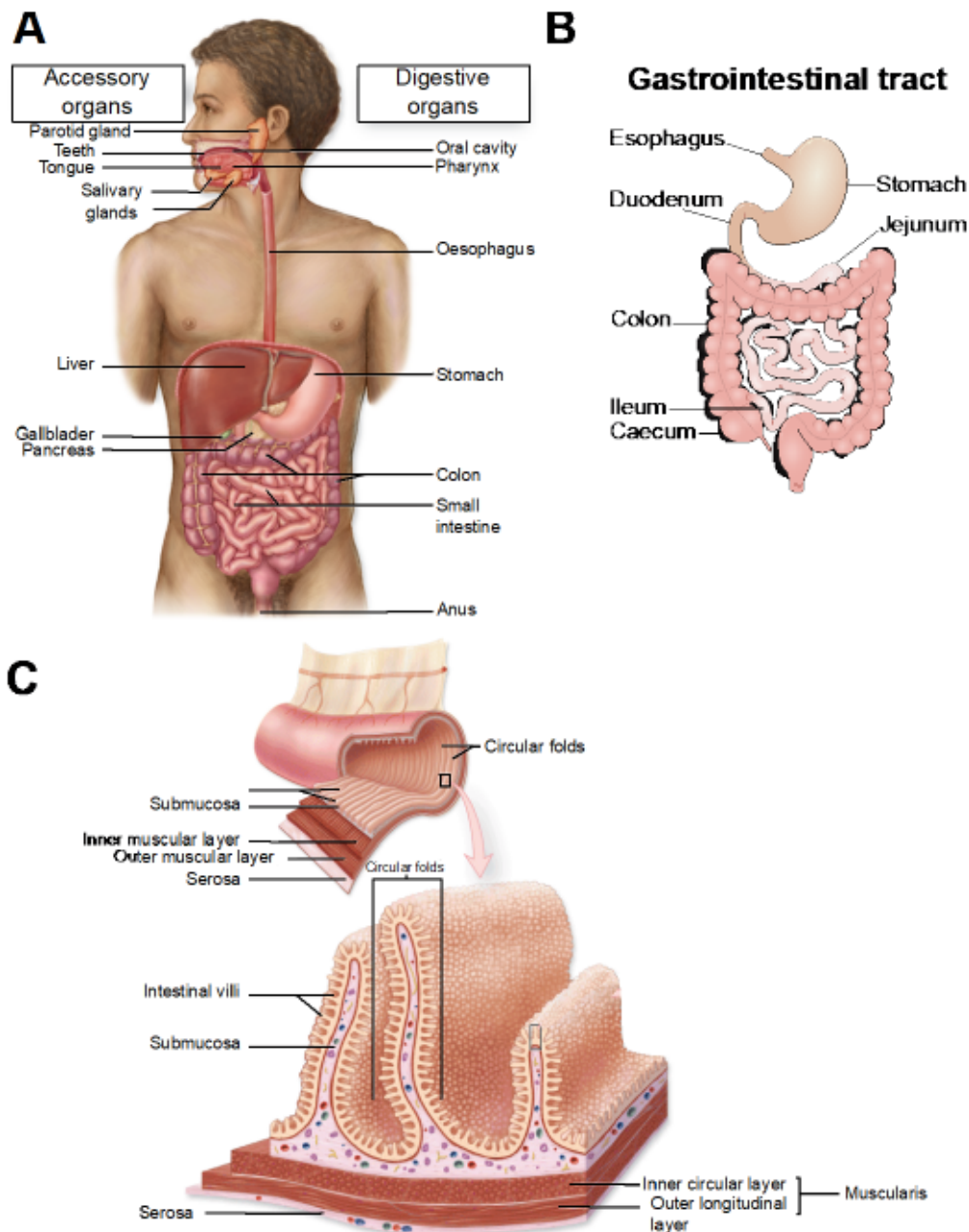


Figure 1 : Architecture et organisation histologique de l'appareil digestif. (A) Schéma de l'appareil digestif. Il se compose du tractus gastro-intestinal constitué par la cavité orale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac puis l'intestin grêle et le colon et se termine par l'anus. L'appareil digestif comprend également des organes dit accessoires participant à la fonction digestive tels que les dents et langue, les glandes salivaires, le foie, le pancréas et la vésicule biliaire (adapté de Junqueira *et al.* 15th Edition). (B) Schéma détaillant les différents segments de l'intestin. A la suite de l'œsophage puis de l'estomac, l'intestin grêle débute à la sortie de l'estomac, au pylore, par le duodénum puis le jéjunum et se termine par l'iléon aboutissant sur le caecum à la jonction iléo-caecale. Le tube digestif se poursuit le colon ascendant (droit), transverse puis par le colon descendant (gauche) et enfin le colon sigmoïde. Le tractus gastro-intestinal prend fin au niveau du rectum et de l'anus (adapté de Le Gall *et al.* 2018). (C) Représentation des tuniques composant la paroi du tube digestif et des dispositifs d'amplification de la surface intestinale dans l'intestin grêle. Sur le plan histologique, la paroi du tube digestif est composée de cinq tuniques : une tunique externe (sérosuse ou adventice aux extrémités du tractus), deux couches de muscles (*muscularis*, longitudinale externe et circulaire interne), une musculaire-muqueuse et enfin la muqueuse. La muqueuse est elle-même constituée par la lamina propria (ou chorion), tissu conjonctif dans lequel sont présents des cellules de l'immunité intestinale, vaisseaux lymphatiques et sanguins, et la monocouche de cellules épithéliales reposant sur une lame basale. Afin d'assurer sa fonction d'absorption de nutriments, l'intestin grêle présente des anses intestinales et valvules conniventes (*circular folds*) ainsi que des villosités, permettant d'amplifier la surface d'absorption de l'intestin (adapté de Junqueira *et al.* 13th Edition).

Afin d'augmenter la surface d'échange de l'intestin grêle, dont la fonction principale est l'absorption de nutriments, celui-ci présente, chez l'Homme, deux **dispositifs d'amplification de surface** : un dispositif anatomique constitué par les anses intestinales et les valvules conniventes, et un dispositif histologique comportant les villosités intestinales et les microvillosités – ou bordure en brosse – des entérocytes, cellules épithéliales assurant l'absorption des nutriments (Figure 1C). Le colon, dont la fonction principale est la compaction des selles *via* la recapture de l'eau, est dépourvu de replis et de villosités intestinales, et les cellules épithéliales qui le composent comportent des microvillosités, qui sont néanmoins plus courtes que dans l'intestin grêle (Helander *et al.* 2014). La structure et l'anatomie du tractus digestif lui permettent de bénéficier d'une surface d'absorption, de la cavité orale au colon, d'environ 32m² (Helander *et al.* 2014).

ii. Organisation tissulaire et cellulaire

Au niveau de l'intestin grêle chez l'Homme et les rongeurs, l'épithélium est organisé en cryptes de Lieberkühn et villosités structurées selon un **axe crypto-villositaire** (Figure 2A), tandis que dans le colon, on retrouve uniquement des cryptes et un épithélium de surface plane (Figure 2B) (Radtke *et al.* 2005). Les cryptes correspondent au compartiment prolifératif et forment une niche qui héberge les cellules souches intestinales (Barker 2014), donnant naissance aux cellules post-mitotiques (dites *transit amplifying*). Après division asymétrique et prolifération, les cellules se différencient permettant des **spécialisations cellulaires fonctionnelles** (Figure 2C). Les cellules différenciées migrent en cohorte jusqu'à l'apex des villosités ou de l'épithélium de surface avant d'être extrudées de l'épithélium et de subir une mort cellulaire par **anoïkis** (apoptose par détachement de la matrice extracellulaire) (Barker 2014; Fouquet *et al.* 2004). Ce mode de renouvellement permet d'assurer le maintien de l'intégrité de l'épithélium. Le renouvellement complet de l'épithélium est accompli en seulement quelques jours : 2 à 4 jours chez la souris et 3 à 5 jours chez l'Homme pour les entérocytes (Darwich *et al.* 2014).

A partir des cellules souches multipotentes, émergent les différents types spécialisés de cellules épithéliales intestinales. Dans l'intestin grêle, environ 90% de l'épithélium est constitué par les **entérocytes**, cellules absorbives, 8 à 10% par les cellules à mucus et moins d'1% par **cellules entéro-endocrines**, ainsi que les **cellules de Paneth**, localisées dans les cryptes, ces trois dernières appartenant au lignage sécrétoire (Figure 2A).

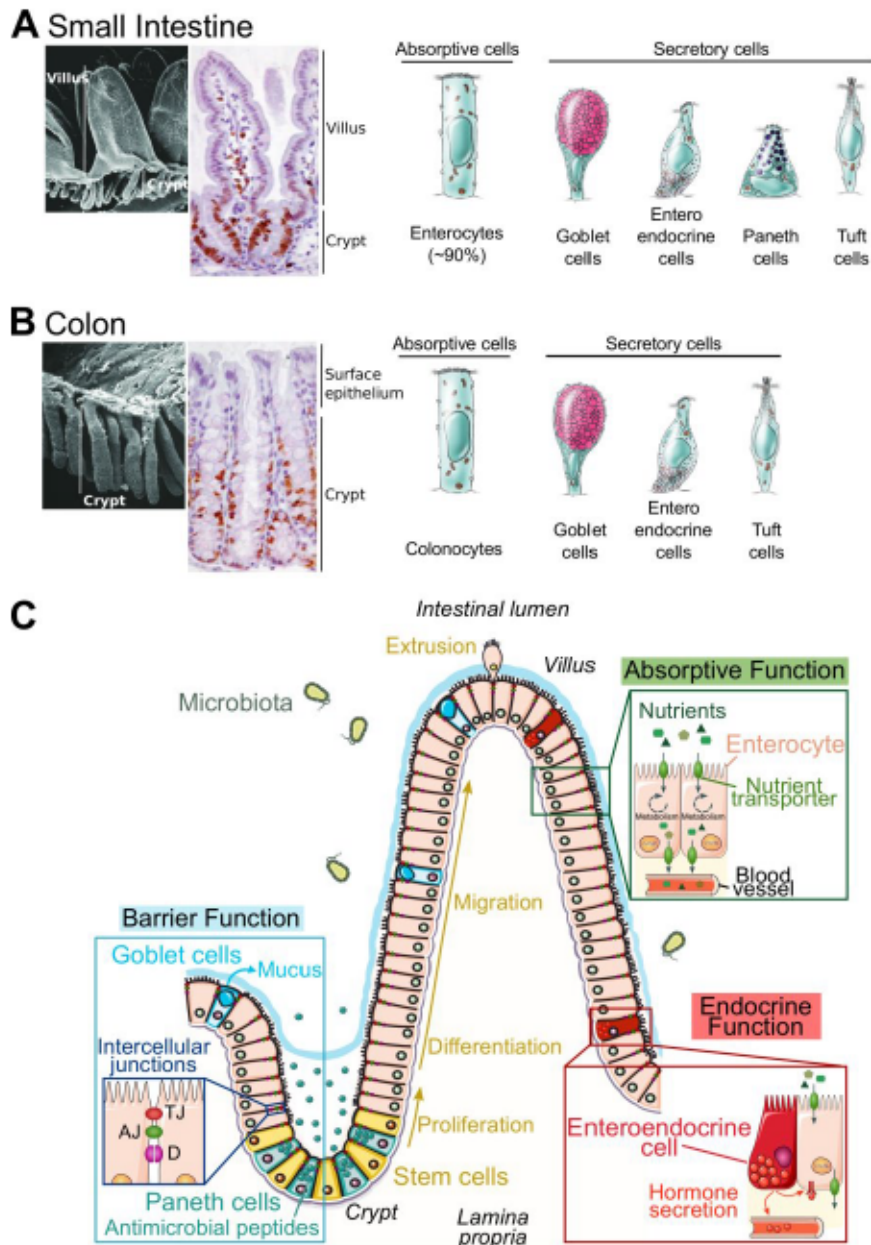


Figure 2 : Spécificités cellulaires de l'intestin grêle et du colon. (A) Structure de l'épithélium de l'intestin grêle. L'épithélium de l'intestin grêle s'organise selon un axe crypto-villositaire (illustré à gauche par microscopie électronique de Magney *et al.* (1986) et au centre par une image d'immunohistochimie du marqueur de prolifération Ki-67 de Radtke *et al.* (2005)). L'épithélium de l'intestin grêle comporte cinq types de cellules épithéliales différenciées : les entérocytes, cellules absorbatives représentant environ 90% des cellules épithéliales, les cellules à mucus (*goblet cells*), les cellules entéro-endocrines, les cellules de Paneth et les cellules tuft, ces quatre dernières appartenant au lignage sécrétoire (panneau de droite, adapté de Barker *et al.* (2007)). Les cryptes contiennent les cellules de Paneth, les cellules souches intestinales et les progéniteurs en prolifération. Les cellules M ne sont pas représentées. **(B) Structure de l'épithélium du colon.** L'épithélium du colon ne présente pas de villosités mais uniquement des cryptes et un épithélium dit de surface. L'épithélium du colon est composé de colonocytes, de nombreuses cellules à mucus, cellules entéro-endocrines et cellules tuft (panneau de droite adapté de Barker *et al.* (2007)). **(C) Différenciation des cellules épithéliales et leurs fonctions dans l'intestin grêle.** A partir des cellules souches, situées dans les cryptes, les cellules épithéliales prolifèrent le long de l'axe crypto-villositaire et se différencient. La fonction d'absorption des nutriments vers la circulation sanguine est assurée par les entérocytes, exprimant des transporteurs de divers nutriments à leur pôle apical et basolatéral. La fonction endocrine est assurée via la libération d'hormones par les cellules entéro-endocrines dans la circulation. Enfin, la fonction de barrière fait intervenir les cellules à mucus (*goblet cells*), sécrétant dans la lumière les mucines qui forment la couche de mucus, les cellules de Paneth sécrétant des peptides antimicrobiens. Toutes ces cellules épithéliales sont connectées par des jonctions intercellulaires, qui participent au maintien de la structure du tissu et contrôlent le passage de molécules présentes dans la lumière intestinale (Le Gall *et al.* 2018, en annexe).

On peut également noter la présence de **cellules tuft** qui ont un rôle chimio-sensoriel et de **cellules M** (pour *microfolds*), spécialisées dans la capture d'antigènes présents dans la lumière intestinale ; ces dernières sont localisées au-dessus des plaques de Peyer, follicules lymphoïdes de l'intestin grêle (Allaire *et al.* 2018).

Dans le colon, les cellules épithéliales se différencient en **colonocytes** pour le lignage absorbant et en **cellules à mucus**, **cellules entéro-endocrines** et **cellules tuft**, pour le lignage sécrétoire (Figure 2B). La proportion de cellules à mucus est plus importante dans le colon que dans l'intestin grêle, et est associée à une plus grande abondance du microbiote intestinal. A noter qu'il existe, pour certains des types de cellules épithéliales, des sous-types cellulaires avec des fonctionnalités précises (détaillés dans Allaire *et al.* 2018).

iii. Les différentes fonctions de l'intestin

Les spécificités physiologiques des segments du tube digestif garantissent les différentes étapes de la digestion. L'épithélium intestinal joue un rôle central dans les différentes fonctions de l'intestin, qui en plus de la **fonction d'absorption** de nutriments, incluent la **fonction endocrine** et la **fonction de barrière**. D'un point de vue cellulaire, la différenciation des cellules épithéliales intestinales leur confère des propriétés fonctionnelles, leur permettant de participer à une ou plusieurs de ces fonctions (Figure 2C).

Les entérocytes, cellules majoritaires de l'épithélium, expriment aux membranes apicale et basolatérales un répertoire de transporteurs (comme la famille des *GLucose Transporter* (GLUT) et *Sodium Glucose Linked Transporter 1* (SGLT1) pour le transport des sucres, *Peptide Transporter 1* (PEPT1) pour les peptides, *Cluster of Differentiation-36* (CD36) et *Scavenger Receptor class B-Type 1* (SRB-1) pour les lipides) leur permettant d'assurer le **transport de divers nutriments** depuis la lumière intestinale vers la circulation sanguine, et ce de façon dynamique en réponse aux repas (Le Gall *et al.* 2018, en annexe).

L'intestin est également le **principal organe endocrine** du corps humain (Reinehr *et al.* 2015). Cette fonction est, entre autres, garantie par les cellules entéro-endocrines (Figure 2C) qui sécrètent, tout le long du tube digestif, plus de 20 **entéro-hormones** telles que le *Glucagon Like Peptide-1* et *-2* (GLP-1, -2), *Gastric Inhibitory Peptide* (GIP), *Peptide Tyrosine Tyrosine* (PYY). Le GLP-1 est, par exemple, sécrété en réponse à un repas et potentialise la production d'insuline par le pancréas pour réguler la glycémie (Le Gall *et al.* 2018).

Enfin, l'intestin comme tous les autres épithélia du corps, se trouve à l'**interface entre le milieu intérieur et le milieu extérieur**. La muqueuse intestinale fait face à la lumière du tube digestif, milieu riche et complexe par la présence des produits de digestion de l'alimentation et celle du microbiote intestinal. L'intestin exerce donc une **fonction de barrière** (Figure 2C), qui sera abordée en détails dans le chapitre I.B.

iv. Le microbiote intestinal et sa contribution aux fonctions intestinales

Le microbiote intestinal, parfois considéré comme un organe à part entière, est un des composants capitaux de l'intestin et participe à l'ensemble de ses fonctions. En effet, comme d'autres organes tels que le vagin et la peau (Cho *et al.* 2012), l'intestin héberge un microbiote, le plus abondant du corps humain et constitué par diverses espèces de bactéries, champignons, archées et bactériophages (Sausset *et al.* 2020). La colonisation du tube digestif débute à la naissance par contact avec le microbiote vaginal de la mère (ou de la peau en cas de césarienne) et s'étend jusqu'à l'âge de 3 ans environ, terme auquel on considère le microbiote comme stabilisé. Au cours de cette période, l'exposition à différents régimes alimentaires (lait maternel ou industriel, puis nourriture solide) et les contacts avec l'environnement favorisent l'enrichissement et la stabilité du microbiote. Cet écosystème unique est le reflet de **mécanismes de co-évolution** des micro-organismes avec l'hôte, dans le cadre de relations mutualistes et commensales (Donaldson *et al.* 2016).

L'intestin constitue donc un environnement privilégié pour la colonisation par des micro-organismes avec des spécificités physiologiques, selon les segments du tractus digestif, affectant l'abondance et la diversité microbienne (Figure 3A). En effet, l'exposition à l'oxygène et la présence de molécules antimicrobiennes diminuent le long du tube digestif tandis que le pH augmente (Figure 3). Ainsi au niveau de l'estomac, du duodénum et du jéjunum, sont retrouvées des espèces bactériennes **anaérobies facultatives**, dont l'abondance bactérienne est estimée à 10^3 - 10^4 bactéries/mL de contenu (Sender *et al.* 2016). On peut noter que la partie supérieure de l'intestin grêle est également exposée aux acides biliaires qui peuvent avoir un effet sur la composition du microbiote (Donaldson *et al.* 2016). La partie distale de l'intestin grêle, l'iléon, présente une densité plus importante (estimée à 10^8 bactéries/mL de contenu). C'est dans le colon que le microbiote est le plus abondant, estimé à 10^{11} bactéries/mL de contenu (Sender *et al.* 2016), et le plus diversifié, avec de nombreuses espèces **anaérobies strictes** (Figure 3A). La composition et diversité du microbiote intestinal seront abordées plus précisément dans la partie II de l'introduction.

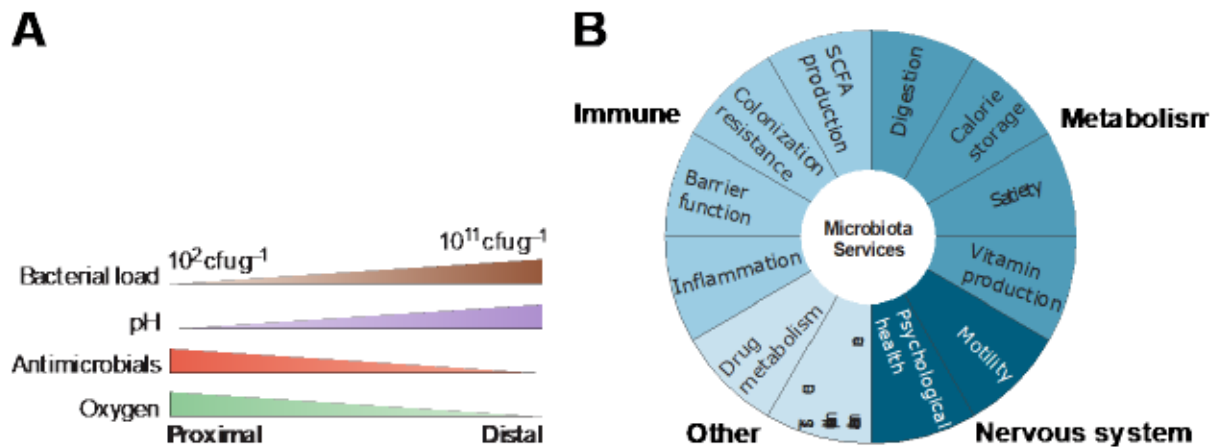


Figure 3 : Répartition du microbiote intestinal et sa contribution aux fonctions intestinales. (A) Gradient de densité bactérienne, pH, molécules antimicrobiennes et oxygène le long de l'axe proximo-distal du tube digestif (Donaldson *et al.* 2016). Le pH est le plus acide au niveau de l'estomac et dans le début de l'intestin grêle (duodénum et jéjunum). Les concentrations en oxygène et en molécules antimicrobiennes (*antimicrobials*, notamment dans l'intestin grêle) sont les plus élevées. Ces facteurs conduisent à une densité bactérienne faible et à la colonisation d'espèces anaérobies facultatives. Les concentrations en oxygène et en molécules antimicrobiennes décroissent le long du tractus, tandis que le pH augmente. La partie distale est celle comprenant la densité (et diversité) bactérienne la plus importante, notamment dans le colon principalement colonisé par des bactéries anaérobies. cfu : *colony forming unit* ; cfu.g⁻¹ : cfu par gramme de fèces. (B) Représentation simplifiée des fonctions rendues par le microbiote à l'écosystème intestinal. Ce diagramme montre certains bénéfices apportés par le microbiote intestinal aux fonctions de l'organe comme la participation à la digestion de produits non digérables par l'hôte et la production de vitamines ou métabolites tels que les AGCC (*Short Chain Fatty Acids*, SCFA), mais aussi la participation à l'homéostasie intestinale en limitant la colonisation intestinale par des organismes non-commensaux, en éduquant le système immunitaire en promouvant la tolérance immunitaire et la fonction de barrière intestinale. Le microbiote intestinal peut également contribuer au métabolisme de composés exogènes comme les médicaments (*drug metabolism*) et interagir avec le système nerveux entérique (notamment *via* les métabolites qu'il produit). Adapté de Sonnenburg *et al.* (2019).

Le microbiote intestinal, dans le cadre de relations mutualistes et commensales, participe à l'ensemble des fonctions de l'intestin, qui lui fournit une niche écologique et garantit la disponibilité de certains nutriments (Figure 3B). En effet, le microbiote est indispensable à l'éducation du système immunitaire intestinal et sa tolérance vis-à-vis des micro-organismes commensaux ainsi qu'au développement d'un intestin fonctionnel. Le microbiote contribue également ainsi au métabolisme de l'hôte (Figure 3B) en produisant la vitamine K et certaines vitamines B qui ne sont pas synthétisables par l'organisme (Canny *et al.* 2008). Il est également responsable de la biotransformation des acides biliaires, présents dans la lumière intestinale, en acides biliaires secondaires, qui peuvent exercer des effets immuno-modulateurs (Shapiro *et al.* 2014). La participation majeure du microbiote à la fonction métabolique est illustrée par la biotransformation de différents substrats alimentaires en produits métabolisables et sources d'énergie pour l'hôte et le microbiote (Figure 3B). La fermentation, par le microbiote, des fibres alimentaires solubles (polysaccharides non digérables par l'hôte et oligosaccharides) ou sucres non absorbés en alcools en est un exemple connu. Les fibres sont une source majeure de

nutriments pour les bactéries anaérobies dans le cæcum et le colon et lors d'un régime pauvre en fibres, certaines bactéries, capables de dégrader les mucines de l'hôte, utilisent celles-ci comme source alternative de nutriments, au détriment de la barrière intestinale (Desai et al. 2016; Schroeder et al. 2018). Ces substrats sont métabolisés en **Acides Gras à Chaine Courte (AGCC)** (Figure 3B), principalement l'acétate, le propionate et le butyrate (Makki et al. 2018). Le butyrate, bien qu'il soit le moins abondant des AGCC, est une source importante d'énergie pour les colonocytes et est consommé localement, tandis que le propionate et l'acétate sont drainés dans la veine porte (Koh et al. 2016).

B. FONCTION DE BARRIERE INTESTINALE

L'intestin est un organe ouvert sur le milieu extérieur et la muqueuse intestinale est à l'interface entre la lumière du tube digestif et le milieu intérieur. L'un des rôles de l'intestin est d'assurer une fonction de barrière, garantissant des échanges contrôlés entre les compartiments. La barrière intestinale fait intervenir différents acteurs que nous allons présenter.

i. Barrière écologique

La colonisation du tube digestif par le **microbiote commensal** ou **résidant** agit comme une première barrière vis-à-vis d'autres micro-organismes, potentiellement pathogènes (Figure 3B). En effet, la consommation de nutriments, présents dans le tube digestif, par la population de micro-organismes résidants permet de limiter leur disponibilité pour d'autres espèces non résidentes, et donc, par effet de **compétition** modifie l'accès à la niche écologique et modère leur installation ou prolifération. Cet effet peut être illustré par la modification, transitoire, de la composition bactérienne intestinale survenant suite à la prise d'antibiotiques (Keeney *et al.* 2014). Les archées et entérobactéries sont capables de synthétiser une large variété de peptides antimicrobiens, respectivement, **archéocines** et **bactériocines** (bactéries Gram-positives) ou **microcines** et **colicines** (bactéries Gram-négatives) (Rebuffat 2012). Ces molécules, dont les mécanismes d'action sont divers, sont sécrétées en réponse à un environnement donné et permettent de moduler la composition locale d'une communauté (Ohland *et al.* 2015). En outre, on peut mentionner le rôle des **bactériophages** comme acteurs de l'écosystème pouvant moduler la composition bactérienne (Sausset *et al.* 2020).

Comme mentionné plus haut, le microbiote participe à l'architecture de l'épithélium et à l'éducation du système immunitaire intestinal (Figure 3B). En effet, l'intestin de souris axéniques ou non colonisées présente une architecture immature, avec une diminution du renouvellement épithélial, de la paroi musculuse, de la couche de mucus, du nombre de cellules immunitaires et un tissu lymphoïde associé désorganisé (Abrams *et al.* 1962; Smith *et al.* 2007). L'utilisation de modèles axéniques ou gnotobiotiques a permis de montrer l'influence du microbiote sur différents paramètres immunologiques et épithéliaux (Bauer *et al.* 2006). De plus, une étude de 2009 a montré que les souris axéniques sont plus sensibles au développement d'une colite inflammatoire induite par un agent chimique, le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) que les souris conventionnelles (Maslowski *et al.* 2009), soulignant la participation bénéfique du microbiote sur l'intégrité de l'épithélium intestinal. L'addition d'un AGCC, l'acétate, permet de prévenir partiellement la colite inflammatoire. De plus, le butyrate, inhibiteur connu des histones désacétylases, et d'autres AGCC exercent des effets bénéfiques sur l'homéostasie intestinale en favorisant la tolérance du système immunitaire *via* l'induction de la réponse Treg et la diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Koh *et al.* 2016; Vinolo *et al.* 2011). Ceci illustre le rôle protecteur du microbiote *via* ses métabolites.

Outre son action sur l'intégrité de l'épithélium et sur le système immunitaire, le microbiote peut également influencer d'autres acteurs de la barrière intestinale tels que les peptides antimicrobiens (AMPs) ou la couche de mucus (Natividad *et al.* 2013), qui seront détaillés dans les sections suivantes. Bien que l'expression de certains AMPs par les cellules de Paneth soit constitutive et ne requiert pas la présence de micro-organismes, comme montré dans un modèle murin axénique (Putsep *et al.* 2000), d'autres études ont montré que l'expression de certains AMPs augmente entre l'âge foetal et adulte chez l'Homme (Mallow *et al.* 1996) et la souris (Ouellette *et al.* 1989) et que la flore résidante induit l'expression de certains AMPs chez la souris (Cash *et al.* 2006). De nombreuses études, peu récentes (Kandori *et al.* 1996; Szentkuti *et al.* 1990) ou plus actuelles (Johansson *et al.* 2015; Petersson *et al.* 2011), ont montré que l'intestin des souris axéniques présentent une couche de mucus d'épaisseur moindre que les souris conventionnelles, les sensibilisant au développement d'une colite induite par le DSS (Petersson *et al.* 2011). De plus, l'épaisseur de la couche de mucus peut être restaurée en exposant les souris axéniques à des produits de la paroi bactérienne tels que le LPS (LipoPolySaccharide) and PGN (peptidoglycanes) (Petersson *et al.* 2011). La colonisation du tube digestif de souris axéniques par le microbiote permet de rétablir les propriétés respectives du mucus dans l'intestin grêle et le colon en 5 à 6 semaines (Johansson *et al.* 2015).

Le rôle de la colonisation de l'intestin par le microbiote sur la cohésion cellulaire et la maturation des complexes de jonctions intercellulaires est moins clair. Une étude montre des jonctions cellules-cellules altérées chez des souris axéniques comparées aux souris conventionnelles (Kozakova *et al.* 2016) tandis que d'autres résultats exposent une perméabilité paracellulaire diminuée chez les souris axéniques par rapport aux souris conventionnelles (Hayes *et al.* 2018). Dans ces deux études, la colonisation de souris axéniques, soit par 3 souches bactériennes (Kozakova *et al.* 2016), soit par un microbiote fécal humain (Hayes *et al.* 2018), permet de modifier ces paramètres de la barrière en atténuant ou supprimant les différences avec les souris conventionnelles. Les effets d'un AGCC, le butyrate, sur la perméabilité paracellulaire sont variables puisqu'il la diminue à faible dose et l'augmente à forte dose (Peng *et al.* 2007), suggérant qu'un rôle complexe de ces métabolites sur la **barrière intestinale**.

L'ensemble de ces éléments illustre la participation, directe ou indirecte, du microbiote à la fonction de barrière intestinale.

ii. Barrières biochimique et immunologique

a. Peptides antimicrobiens

La production de **peptides antimicrobiens (AMPs)** est un mécanisme hautement conservé parmi les organismes multicellulaires et permet de tuer ou d'inactiver rapidement bactéries, virus et champignons. Chez les mammifères, la majorité des AMPs est produite par les épithélia interagissant directement avec l'environnement comme l'intestin, la peau, les voies respiratoires, etc... Dans l'intestin, les AMPs sont sécrétés dans la lumière de l'intestin grêle et du colon (Figure 4) et leur expression est soit constitutive soit induite (Natividad *et al.* 2013). Il existe principalement deux modes de destruction des bactéries par les AMPs : la **formation de pores** dans la paroi bactérienne (familles des Défensines, Lectines de type C et Cathélicidines) ou bien les AMPs présentant une **activité enzymatique** (comme le Lysozyme, la phospholipase A2 et la RNase Angiogenin-4).

La famille des **Défensines**, détruisant les bactéries Gram-positives et -négatives, est subdivisée en 3 groupes majeurs : les α -, β - et θ -Défensines. L'expression des deux α -Défensines humaines (*Human Defensin-5* et *Human Defensin-6*) et des deux α -défensines murines (appelées Cryptidines, pour leur localisation dans les cryptes) est principalement limitée aux

cellules de Paneth, tandis que les β -Défensines (*Human Beta Defensin-1, -2, -3* chez l'Homme et uniquement *mouse Beta Defensin-3* chez la souris) sont exprimées par les cellules de Paneth, les entérocytes et les colonocytes (Hooper 2015) (Figure 4A).

Les Lectines de type C, solubles, comprenant chez la souris *Regenerating islet-derived protein 3- β* (RegIII- β) et RegIII- γ (appelé RegIII- α chez l'Homme), se lient aux peptidoglycanes de la paroi des bactéries Gram-positives et sont exprimées par les cellules de Paneth, entérocytes et colonocytes (Figure 4A). On peut ajouter que dans le colon (Figure 4B), les cellules à mucus produisent, en réponse à une infection, la molécule *Resistin-Like Molecule- β* (RELM β) dont il a été montré que les formes humaines et murines détruisent *in vitro* la paroi de bactéries Gram-négatives telles que le pathogène murin *Citrobacter rodentium* et le le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* (Propheter *et al.* 2017). A noter que les β -Défensines et les Lectines agissent aussi contre les champignons (Underhill *et al.* 2014).

Le Lysozyme, à activité glycosidase (ciblant plus efficacement les peptidoglycanes des bactéries Gram-positives) et la Phospholipase A2 (hydrolysant les phospholipides des membranes bactériennes) sont des AMPs sécrétés par les cellules de Paneth (Figure 4A).

Il est estimé que les granules de sécrétion des cellules de Paneth contiennent à 70% des Défensines et que le reste est représenté par les autres AMPs (Natividad *et al.* 2013).

Ainsi, les AMPs sont un des mécanismes rapides de défense par lesquels les cellules épithéliales intestinales participent à maintenir l'équilibre des interactions entre hôte et microbiote.

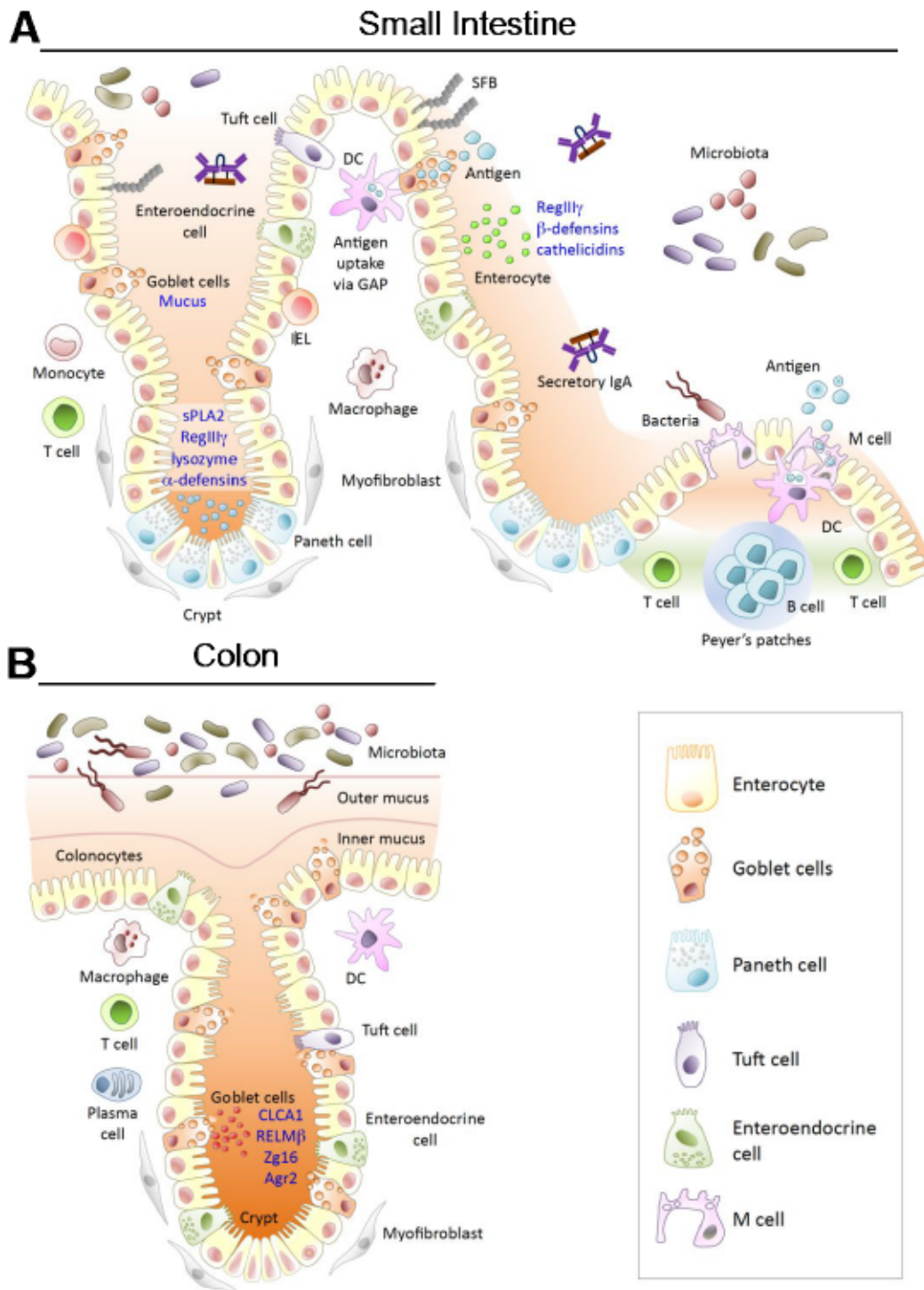


Figure 4 : Mécanismes de défenses de la muqueuse intestinale (adapté de Allaire *et al.* 2018). **(A) Dans l'intestin grêle**, les cellules de Paneth, localisées dans le fond des cryptes, sécrètent divers AMPs (phospholipase A2, ou sPLA2, RegIII- α chez l'Homme ou - β et - γ chez la souris, le Lysozyme et les α -Défensines). Les entérocytes sécrètent, quant à eux, les β -Défensines, les Cathélicidines et les AMPs de la famille RegIII cités ci-dessus. La lamina propria héberge des cellules dispersées de l'immunité innée (macrophages, monocytes, cellules dendritiques (*Dendritic Cells*, DC) et des cellules du Gut-Associated-Lymphoid Tissue (GALT) comme les lymphocytes T, B et intra-épithéliaux (*Intra-Epithelial Lymphocytes*, IEL). L'iléon est riche en plaques de Peyer (*Peyer's patches*), follicule lymphoïde du GALT, permettant le contact entre les cellules épithéliales M, qui échantillonnent les antigènes luminaux et les présentent aux lymphocytes B, qui produiront des IgA sécrétées (*secretory IgA*) et aux lymphocytes T. **(B) Dans le colon**, les cellules à mucus (*goblet cells*) sécrètent les mucines et d'autres protéines (CLCA1, Zg16, Agr2) formant la couche de mucus. Les cellules à mucus sécrètent également un AMP, le RELM β , et ont un rôle de sentinelle des antigènes luminaux, assurant les défenses innées dans ce segment dénué de cellules de Paneth.

b. Immunité et *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (GALT)

La muqueuse intestinale héberge un système de défense complexe qui permet d'assurer une protection vis-à-vis de micro-organismes potentiellement pathogènes tout en garantissant une certaine tolérance envers le microbiote résidant afin de maintenir l'homéostasie intestinale. Le système de défense intestinal comporte une composante innée et un système de réponse adaptatif.

Le système de défense inné fait intervenir, en plus des peptides antimicrobiens mentionnés ci-dessus et du rôle du mucus, les cellules épithéliales et des cellules immunitaires telles que les macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, éosinophiles et cellules *Natural Killer* (NK), dispersées dans la *lamina propria* (Figure 4). Les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules épithéliales expriment des récepteurs membranaires ou cytoplasmiques (*Pattern Recognition Receptor*, PRR) reconnaissant des motifs associés aux pathogènes (*Pathogen/Microbial Associated Molecular Patterns*, PAMPs/MAMPs). On peut citer, comme groupes connus des PRRs, la famille des *Toll-Like Receptor* (TLR), *NOD-Like Receptor* (NLR) et *RIG-I-Like Receptor* (RLR) (Winer *et al.* 2017). Dans les cellules épithéliales intestinales, l'activation des PRRs après liaison avec le ligand induit notamment la sécrétion d'AMPs, de mucus, et de cytokines pro-inflammatoires (Allaire *et al.* 2018).

Les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques et macrophages, localisés dans la *lamina propria*, et les cellules M (localisées dans la monocouche épithéliale recouvrant les plaques de Peyer) ont un rôle d'échantillonnage des antigènes luminaux, microbiens ou alimentaires, et jouent un rôle d'intermédiaire entre immunité innée et adaptative (Figure 4).

Le système immunitaire adaptatif comprend principalement les plasmocytes, les lymphocytes B ou T, résidant dans la *lamina propria* ou intra-épithéliaux. Le système immunitaire intestinal s'organise au sein du *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (GALT, Figure 4A), qui, en plus des cellules immunitaires dispersées dans la *lamina propria*, comprend les plaques de Peyer (groupements de follicules lymphoïdes situés entre la muqueuse et la sous-muqueuse de l'iléon distal), des follicules lymphoïdes isolés dans le colon et des ganglions mésentériques lymphatiques (Winer *et al.* 2017). Les follicules lymphoïdes, structures majeures du lien entre immunité innée et adaptative (Jung *et al.* 2010), permettent le contact entre cellules

présentatrices d'antigènes et lymphocytes B ou T qui sont alors activés et migrent dans les ganglions mésentériques. Au contact d'un antigène, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes produisant des immunoglobulines A (IgA). Après différenciation, ils peuvent atteindre et infiltrer les sites effecteurs de l'épithélium intestinal. Les lymphocytes B sont concentrés dans les plaques de Peyer tandis que les lymphocytes CD4⁺ sont répartis plus uniformément dans la *lamina propria* dans les villosités et cryptes (Figure 4A). Les lymphocytes CD8⁺ peuvent infiltrer l'épithélium (lymphocytes intra-épithéliaux), bien qu'environ 40% résident dans la *lamina propria* (Figure 4) (Mowat 2003).

En l'absence d'inflammation, lorsque des antigènes de bactéries commensales ou alimentaires sont détectés et capturés par les cellules présentatrices d'antigènes, l'activation, puis différenciation, des lymphocytes T naïfs est orientée vers un phénotype régulateur : ils se différencient en lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) produisant majoritairement l'interleukine-10 anti-inflammatoire ou bien en lymphocytes T helper (T_H3) produisant la cytokine anti-inflammatoire TGFβ (*Transforming Growth Factor β*). Ceci promeut la tolérance et l'homéostasie immunitaire. Dans le cas de la détection d'antigènes de bactéries pathogènes, l'inflammation locale favorise la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype T_H1, qui produisent des cytokines pro-inflammatoires comme par exemple l'interféron-γ. À terme, les cellules régulatrices permettent d'atténuer la réaction immunitaire et de retrouver l'homéostasie (Mowat 2003).

Ainsi, l'équilibre entre l'hôte et le contenu de la lumière intestinal, notamment le microbiote, est maintenu grâce à divers mécanismes, telle que l'atténuation de la réponse inflammatoire, qui permettent au système immunitaire de tolérer les antigènes de bactéries commensales et de répondre de façon adaptée aux micro-organismes non résidants. Cet équilibre est rompu lors d'une inflammation intestinale et dans de nombreuses pathologies digestives que nous aborderons plus loin.

iii. Barrière physique

La barrière intestinale forme également une frontière physique entre la lumière de l'intestin (milieu extérieur) et le compartiment intérieur. Cette barrière physique est constituée par une couche de mucus et par la présence de jonctions intercellulaires entre les cellules épithéliales, et plus particulièrement les jonctions serrées.

a. Rôle du mucus

La couche de mucus, que l'on retrouve chez les mammifères dans l'intestin (à partir de l'estomac) et dans les voies respiratoires, permet de maintenir une distance physique, et éventuellement sélective, entre microbiote et épithélium (Figure 5). Les cellules à mucus produisent et sécrètent des mucines, dont les propriétés physico-chimiques leur permettent de former un gel constitué à 95% d'eau. En effet, ces protéines sont hautement O-glycosylées et s'oligomérisent, par la formation de ponts disulfures, créant ainsi une structure réticulaire capturant eau et ions (Hansson 2019). La couche de mucus exerce un rôle de barrière par deux principes simples : (i) nettoyer la surface par lubrification et élimination du mucus et des débris qu'il contient et (ii) former une couche protectrice isolant la monocouche épithéliale.

Chez l'Homme et la souris, 9 mucines, de nature acide ou neutre, sont exprimées dans l'intestin grêle et le colon et sont soit liées à la membrane soit sécrétées (Natividad *et al.* 2013). La mucine 2 (MUC2) est la principale mucine sécrétée dans l'intestin et les souris invalidées pour son gène développent spontanément une colite inflammatoire distale, et éventuellement un prolapsus rectal (Van der Sluis *et al.* 2006), soulignant le rôle du mucus dans la barrière intestinale.

Brièvement, les cellules à mucus expriment et sécrètent, d'autres protéines participant à la structure du mucus (Figure 4B) : le *Calcium-Activated Chloride Channel Regulator 1* (CLCA1) à activité métalloprotéase qui régule la structure du mucus (Nystrom *et al.* 2018), *Fcg-binding protein* (Fcgbp) qui a un rôle de *cross-linker* de MUC2. En outre, *Anterior Gradient Homolog 2* (Agr2) est une protéine disulfure isomérase présente dans le réticulum endoplasmique des cellules à mucus du colon chez la souris, qui catalyse la formation de ponts disulfures nécessaires à la maturation correcte de MUC2 (Park *et al.* 2009). L'ensemble de ces protéines forme un gel de mucus dont la taille des pores peut varier, permettant ou limitant plus ou moins la diffusion de micro-organismes. On peut enfin citer la protéine de type lectine *Zymogen Granule Protein 16* (Zg16) qui permet l'agrégation des bactéries Gram-positives dans la couche de mucus, empêchant leur passage vers les couches plus proches de l'épithélium (Allaire *et al.* 2018).

La couche de mucus est organisée différemment dans l'intestin grêle et le colon (Figure 5). Dans l'intestin grêle (Figure 5A), une couche de mucus unique recouvre toute la hauteur de l'épithélium, jusqu'en haut des villosités. Bien que la taille des pores du gel n'exclue pas l'entrée de bactéries dans ce segment intestinal, la couche de mucus forme une barrière qui limite la diffusion des bactéries, renforcée par la présence d'AMPs (Hansson 2019). Dans le colon (Figure 5B), le mucus est organisé en deux couches : une couche interne, stérile, dont le réseau forme des pores de taille inférieure à 1µm (d'une épaisseur de 50-70µm chez la souris et 250-300µm chez l'Homme dans la partie distale) et une couche externe, plus lâche, hébergeant des bactéries résidentes, qui peuvent notamment utiliser les glycanes du mucus comme source de nutriments tout en produisant des AGCC. Il est intéressant d'ajouter que des cellules à mucus dites 'sentinelles' se trouvent à l'entrée des cryptes du colon (dénuées de cellules de Paneth) qui peuvent détecter le rapprochement d'un micro-organisme et répondre en déclenchant une sécrétion supplémentaire de mucus afin de favoriser son élimination (Allaire *et al.* 2018; Hansson 2019) (Figure 5B).

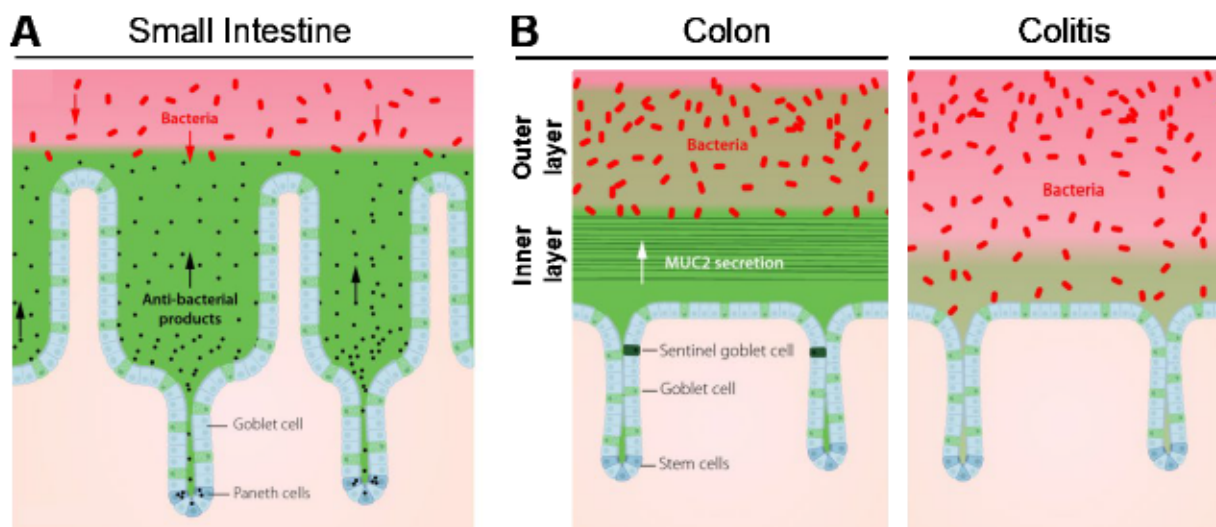


Figure 5 : Organisation de la couche de mucus dans l'intestin grêle et le colon. (A) Dans l'intestin grêle (à gauche) la couche de mucus est unique, enrichie en AMPs (notamment près des cryptes) et limite la diffusion des bactéries. (B) Dans le colon (au milieu), le mucus est organisé en deux épaisseurs : une couche interne (*inner*) stérile et une couche externe (*outer*) dans laquelle résident des micro-organismes commensaux, qui peuvent utiliser les saccharides des mucines comme source de nutriments et produisent des AGCC, métabolisables par l'hôte. Les cellules à mucus sentinelles gardent l'entrée des cryptes. Dans le cas de colite (à droite), la couche de mucus colique est endommagée et le microbiote est alors en contact direct avec l'épithélium intestinal (adapté de Hansson 2019).

b. Les jonctions intercellulaires

Les jonctions cellule-cellule maintiennent la cohésion des cellules épithéliales intestinales organisées en une monocouche et sont une composante physique de la fonction de barrière (Figure 2C). Les **jonctions intercellulaires** maintenant l'épithélium jointif sont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (Figure 6). Ce sont plus spécifiquement les **jonctions serrées** (*Tight Junctions*, TJs) qui assurent la fonction de barrière intestinale en contrôlant, de façon sélective, le passage de molécules lumineales dans l'espace paracellulaire (perméabilité paracellulaire). Les jonctions adhérentes permettent l'adhésion cellulaire et ont un rôle capital dans l'architecture du tissu (Takeichi 2014). Les desmosomes sont impliqués dans la résistance à la déformation et au stress mécanique du tissu (Green *et al.* 2019). Les jonctions communicantes, qui ne sont pas connectées au cytosquelette et qui n'interviennent pas dans l'adhésion cellule-cellule, ne seront pas abordées ici.

Les jonctions serrées (*zonula occludens*) forment, avec les jonctions adhérentes (*zonula adherens*) et les desmosomes (*maculae adherens*), une structure particulière : le **complexe apical jonctionnel**, localisé à l'apex des membranes latérales de cellules adjacentes, juste sous la bordure en brosse (Figure 6A et B). Il est connecté au cytosquelette qui maintient la structure des jonctions, participe à leur régulation dynamique et leur permet de former un réseau dense organisé en ceinture à l'intérieur de la cellule.

Les différents types de jonctions sont des complexes comprenant de nombreuses protéines dont certaines sont spécifiques mais leur architecture moléculaire est dans l'ensemble identique (Figure 6A). Elle repose d'abord sur des protéines transmembranaires (permettant d'accoler les membranes de deux cellules adjacentes), comme la E-Cadhérine et les Nectines (jonctions adhérentes) ou les desmoglénines (desmosomes). Les protéines transmembranaires recrutent au niveau de leur domaine intracytoplasmique des protéines cytoplasmiques adaptatrices qui font le lien avec le cytosquelette, soit les microfilaments d'actine pour les jonctions serrées et adhérentes, soit les filaments intermédiaires dans le cas des desmosomes (Figure 6A et B). On peut citer la famille des caténines comme protéines adaptatrices impliquées dans la structure des jonctions adhérentes et des desmosomes.

Nous reviendrons en détails sur la structure moléculaire des jonctions serrées dans la section suivante. Il est important de noter que, bien que la fonction de barrière soit principalement régie par les jonctions serrées, l'ensemble de ces trois jonctions y participe de façon active et que la dérégulation d'une des jonctions entraîne une altération globale de la fonction de barrière (Mohanani *et al.* 2018; Petit *et al.* 2012).

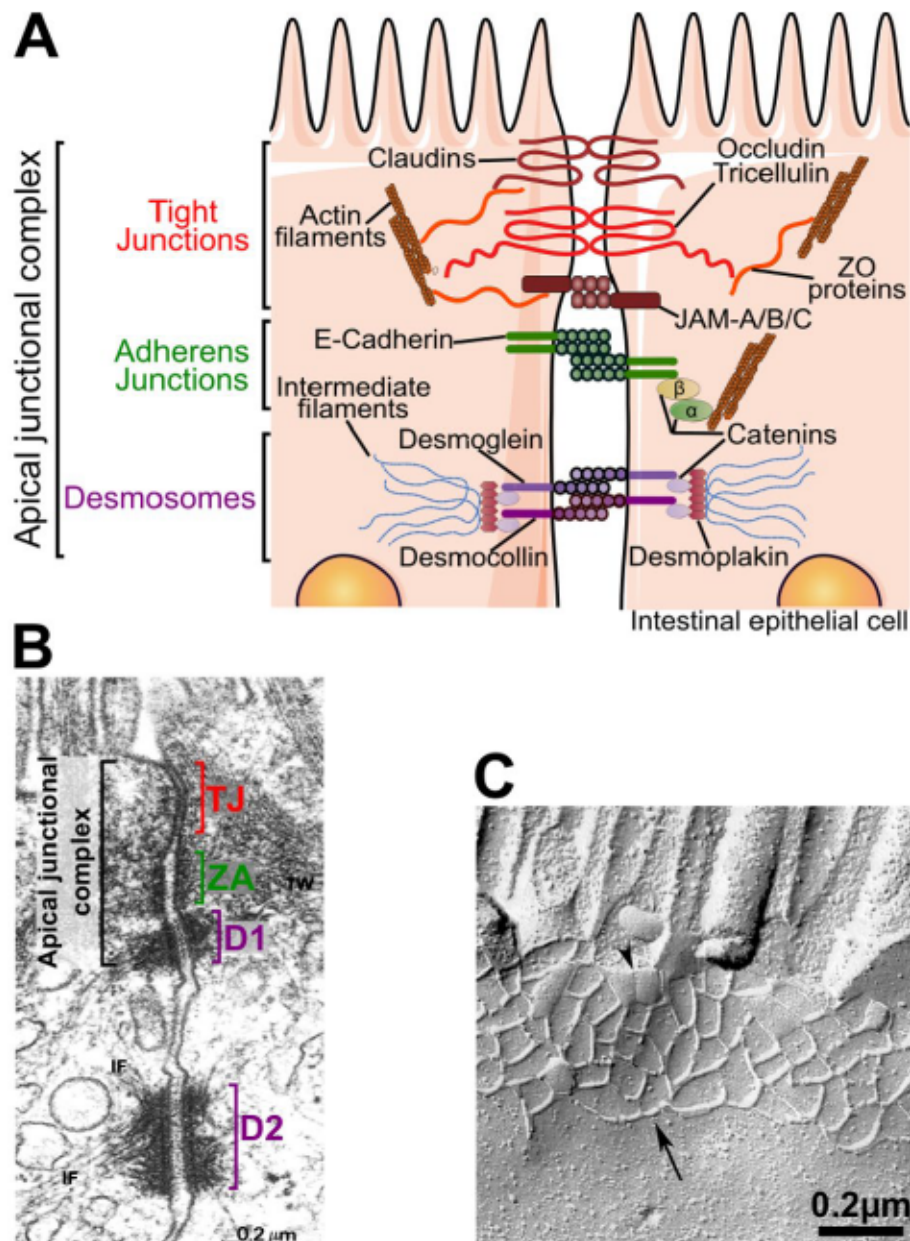


Figure 6 : Le complexe apical jonctionnel. (A) Structure moléculaire des jonctions intercellulaires. Les jonctions serrées (*tight junctions*, TJ) forment, avec les jonctions adhérentes (*adherens junctions*) et les desmosomes une structure particulière : le complexe apical jonctionnel (*apical junctional complex*). Ces trois types de jonctions comprennent des protéines transmembranaires (Claudines, Occludine et Tricelluline pour les jonctions serrées, E-Cadhérine pour les jonctions adhérentes et Desmogléines et Desmocollines pour les desmosomes), des protéines cytoplasmiques adaptatrices (de la famille *Zonula Occludens* (ZO) pour les jonctions serrées et de la famille des Caténines pour les jonctions adhérentes et desmosomes), qui font le lien avec le cytosquelette d'actine contractile (jonctions serrées et adhérentes) ou avec les filaments intermédiaires de kératines (desmosomes) (adapté de Le Gall *et al.* 2018, en annexe). (B) Ultrastructure du complexe apical jonctionnel. Les jonctions serrées (TJ) sont situées dans la partie la plus apicale de la membrane latérale, sous les microvillosités, au-dessus des jonctions adhérentes (ZA, *zonula adherens*), toutes deux étant connectées au cytosquelette d'actine (formant le *terminal web*, TW). Les desmosomes (D1) sont situés plus bas le long de la membrane baso-latérale. D2 désigne un desmosome hors complexe apical jonctionnel. Ils sont connectés aux filaments intermédiaires (IF, *intermediate filaments*) Le cytosquelette apparaît dense aux électrons dans cette image de microscopie électronique à transmission sur coupe fine. Barre d'échelle 200nm (adapté de Young *et al.* 2000) (C) Ultrastructure du réseau de brins de jonctions serrées. Le réseau formé par les protéines des jonctions serrées est visible sous forme de « brins » par microscopie électronique après cryofracture. Barre d'échelle 200nm (adapté de Furuse 2010).

iv. Perméabilité sélective et organisation moléculaire des jonctions serrées

Les jonctions serrées ont trois grandes fonctions : (i) une fonction de délimitation (*fence function*) et de séparation des compartiments membranaires apical et basolatéral des cellules épithéliales, en limitant la diffusion de composants membranaires (lipides ou protéines transmembranaires) ; elles participent donc à la polarité cellulaire ; (ii) une fonction de **plateforme de signalisation** (stress cellulaire, prolifération, différenciation et polarité) ; (iii) la **fonction de barrière**, qui fait l'objet de ce travail, en contrôlant sélectivement le passage paracellulaire de molécules (Chiba *et al.* 2008).

a. **Les différentes voies de passage**

Les flux de molécules présentes dans la lumière intestinale (nutriments, ions, antigènes alimentaires ou bactériens) peuvent s'effectuer, vers le compartiment intérieur, soit en transitant par l'intérieur des cellules épithéliales (voie transcellulaire, qui est un passage actif ou passif *via* des transporteurs ou des canaux), soit par la voie paracellulaire (diffusion passive), permise par l'espace résiduel entre deux membranes de cellules adjacentes. Cette voie de passage, qui définit la **perméabilité paracellulaire**, est contrôlée par les jonctions serrées (Figure 7A).

Pour assurer sa fonction d'absorption, mais aussi d'éducation du système immunitaire et de tolérance vis-à-vis du microbiote et des aliments, l'intestin doit maintenir une **perméabilité sélective** de l'épithélium et non pas une barrière absolue. Cette notion capitale de sélectivité fait de l'épithélium intestinal une barrière moins étanche et stringente que d'autres comme la barrière hémato-encéphalique (Anderson *et al.* 2009).

La perméabilité paracellulaire peut être subdivisée en deux voies de passage distinctes : le '*pore pathway*' et le '*leak pathway*'. Le *pore pathway* permet le **passage d'ions et petites molécules** de façon hautement sélective sur la taille et charge, tandis que le *leak pathway*, peu sélectif, correspond au **passage de macromolécules** (de type fragments des parois bactériennes, antigènes alimentaires) (Figure 7A). Le *pore pathway* représente une grande capacité de passage des ions et petites molécules tandis que le *leak pathway* est, en conditions physiologiques, de très faible capacité (Shen *et al.* 2011). C'est le *leak pathway* qui participe, en conditions physiopathologiques, à l'inflammation intestinale lorsque le passage de macromolécules est dérégulé (Choi *et al.* 2017).

On peut noter que le *pore pathway* peut être étudié en mesurant la Résistance Électrique Trans-Épithéliale (TEER, à l'aide d'électrodes), qui correspond à l'inverse de la conductance ; la

TEER varie donc de façon inversement proportionnelle à la perméabilité aux ions et petites molécules chargées. Le *leak pathway* est étudié *via* la mesure du passage de traceurs de différentes tailles, souvent fluorescents. Ces mesures sont des outils d'étude de la perméabilité *in vitro* des lignées cellulaires, *ex vivo* en chambres de Ussing ou bien *in vivo* pour le passage de traceurs fluorescents (Anderson *et al.* 2009; Thomson *et al.* 2019).

Ces deux voies sont déterminées et contrôlées par différentes protéines transmembranaires des jonctions serrées, dont la nature et les propriétés confèrent leurs caractéristiques et spécificités.

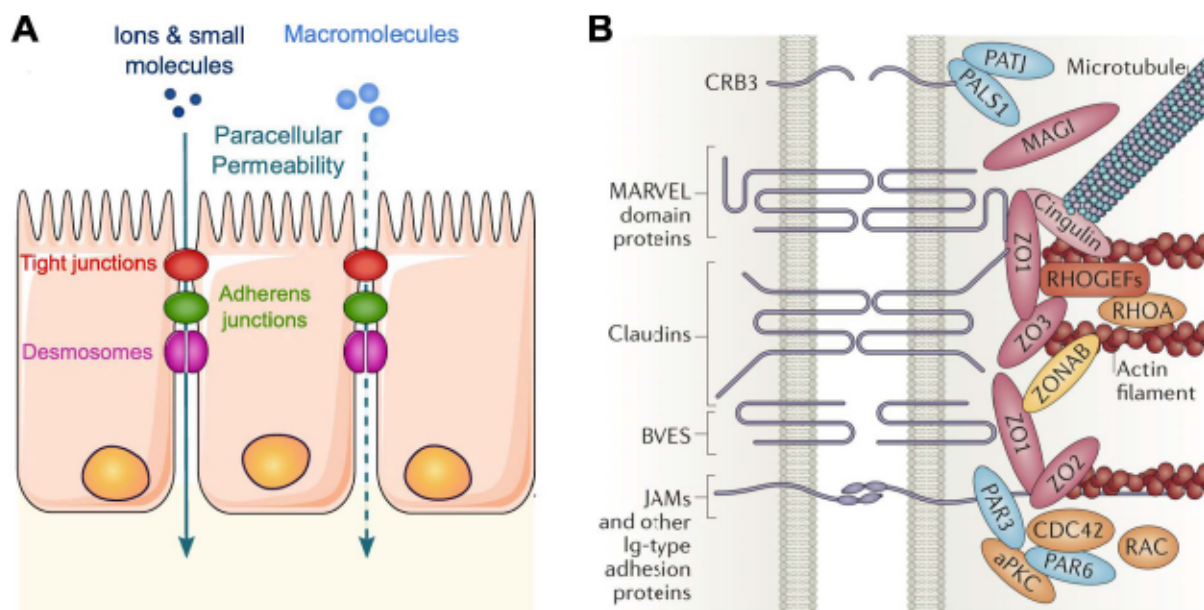


Figure 7 : Perméabilité paracellulaire et composition des jonctions serrées. (A) Les deux voies de passage paracellulaire. Les flux de molécules depuis la lumière intestinale vers le compartiment intérieur peuvent s'effectuer *via* les voies de passage transcellulaire (transports passifs ou actifs) ou paracellulaire (transport passif des ions et macromolécules de petite taille). La perméabilité paracellulaire, représentée ici par les flèches, peut être divisée en deux catégories : le '*pore pathway*' et le '*leak pathway*'. Le '*pore pathway*', permet le passage d'ions et petites molécules de façon sélective sur la taille et la charge et représente une grande capacité de flux. Le '*leak pathway*', de capacité beaucoup plus faible, correspond au passage de macromolécules d'origine alimentaire ou bactérienne (B) Structure moléculaire des jonctions serrées. Le complexe des jonctions serrées se compose de protéines transmembranaires, d'une 'plaque cytosolique' (formée par de nombreuses protéines cytoplasmiques adaptatrices), du cytosquelette, principalement constitué d'acto-myosine (mais aussi microtubules) et de protéines régulatrices et de signalisation. Les protéines transmembranaires (en violet) appartiennent à la famille des TAMPs (protéines à domaines MARVEL avec 4 domaines transmembranaires et contrôlant le *leak pathway*), à la famille des Claudines (avec 4 domaines transmembranaires et contrôlant le *pore pathway*), et à la superfamille des immunoglobulines dont les protéines de la famille des *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs) ; elles comprennent aussi la protéine à 3 domaines transmembranaires BVES (*Blood Vessel Epicardial Substance*). On trouve aux jonctions serrées de nombreuses protéines adaptatrices (ici en rose) faisant le lien avec le cytosquelette d'actine (protéines de la famille *Zonula Occludens* ZO1, 2, 3) ou avec les microtubules (Cinguline). La plaque cytosolique des jonctions serrées comprend également des protéines de signalisation (en orange) comme des protéines kinases et des petites Rho GTPases (Cdc42, Rac et RhoA), des RhoGEFs (en rouge) et des facteurs de transcription (comme ZONAB en jaune). Les jonction serrées impliquent un complexe de polarité (constitué par la protéine à un domaine transmembranaire CRB3 et des protéines de signalisation en bleu) (adapté de Zihni *et al.* 2016).

b. Structure moléculaire des jonctions serrées

Les jonctions serrées (*tight junctions*, TJs) forment des points de contacts entre les membranes de cellules adjacentes, sous forme de réseaux de brins (rendus visibles en microscopie électronique après cryofracture, Figure 6C). Comme les autres jonctions, les complexes des jonctions serrées (Figure 7B) se composent de protéines transmembranaires, d'une 'plaque cytosolique' (formée par de nombreuses protéines cytoplasmiques adaptatrices) et du cytosquelette, principalement constitué d'acto-myosine permettant une certaine contractilité et dynamique. On peut également ajouter la présence de protéines régulatrices et de signalisation (Zihni *et al.* 2016).

Il existe quatre groupes de protéines transmembranaires (TM) des jonctions serrées (Figure 7B) : la grande famille des Claudines, les TAMPs (pour *Tight junction-Associated MARVEL Protein*), ayant toutes deux 4 domaines TM, la protéine à 3 domaines TM *Blood Vessel Epicardial Substance* (BVES) et enfin des protéines à un domaine TM appartenant à la superfamille des immunoglobulines : les protéines de la famille des *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs), et celles des Angulines (aussi nommées *Lipolysis-Stimulated lipoprotein Receptors*, LSRs) (Masuda *et al.* 2011; Higashi *et al.* 2013).

La famille des Claudines, qui contrôlent la perméabilité aux ions et solutés (*pore pathway*) comprend 26 membres chez l'Homme (27 chez la souris). Leurs profils d'expression, qui ne seront pas détaillés ici, diffèrent d'un organe et tissu à l'autre mais également au sein d'un même tissu. C'est notamment le cas dans l'épithélium intestinal, dans lequel les formes de Claudines exprimées varient le long de l'axe proximo-distal du tube digestif mais aussi le long de l'axe crypto-villositaire (Chiba *et al.* 2008; Garcia-Hernandez *et al.* 2017). Elles sont impliquées dans des interactions homo- ou hétérophiliques, en *trans* (Claudines de membranes adjacentes) ou en *cis* (Claudines intégrées dans la même membrane). Quatre Claudines (deux sur chaque membrane) forment un pore de 4 à 8 Å.

Les différentes Claudines, en fonction des acides aminés portés sur les deux boucles extracellulaires, possèdent des affinités différentes pour les anions ou cations, leur conférant ainsi leurs propriétés sélectives. L'expression augmentée de Claudines dites '*pore-sealing*' ou étanches (1, 3, 4, 5, 7, and 19) conduit à une augmentation de la TEER, reflétant une perméabilité aux ions et solutés diminuée. Réciproquement, la surexpression de Claudines dites '*pore-forming*' ou perméables, comme la Claudine 2, induit une augmentation de la perméabilité aux cations (Muto *et al.* 2010).

Une autre famille importante des protéines transmembranaires des jonctions serrées est celle des TAMPs, protéines à domaines MARVEL dont l'Occludine, la Tricelluline et MARVELD3 (Raleigh *et al.* 2010) (Figure 7B).

L'**Occludine** a été la première protéine transmembranaire des jonctions serrées identifiée (Furuse *et al.* 1993). Bien qu'il ait rapidement été montré que sa surexpression dans la lignée épithéliale MDCK augmente la formation des réseaux de brins de scellement au niveau des TJs (McCarthy *et al.* 1996), le rôle de l'Occludine dans la structure des jonctions serrées a été remis en question, entre autres par une étude montrant que des cellules souches embryonnaires déficientes pour l'Occludine se différencient en cellules épithéliales polarisées et forment des jonctions serrées (Saitou *et al.* 1998). De même, les souris délétées pour l'Occludine sont viables et ne présentent pas de défaut majeur de la barrière intestinale (Saitou *et al.* 2000). Néanmoins, la découverte des Claudines puis des autres protéines TAMPs, notamment la Tricelluline, ont amené à proposer un modèle dans lequel ces protéines participent ensemble à la structure des jonctions serrées (Raleigh *et al.* 2010). De plus, la participation de l'Occludine dans le contrôle de la perméabilité aux macromolécules a été confirmée par un modèle d'inactivation dans la lignée de cellules épithéliales intestinales Caco-2, conduisant à une augmentation du passage des macromolécules, de façon taille-dépendante (et non pas des ions) (Al-Sadi *et al.* 2011), réaffirmant son rôle dans la perméabilité paracellulaire, plus particulièrement dans le *leak pathway*.

L'identification de la **Tricelluline** en 2005 (Ikenouchi *et al.* 2005) a permis d'apporter de nouveaux éléments majeurs sur la structure des jonctions serrées (Figure 8A et B). Il existe quatre isoformes humaines de cette protéine. L'isoforme TRIC-a, la plus longue et communément appelé Tricelluline (Riazuddin *et al.* 2006), est exprimée dans divers tissus épithéliaux (Ikenouchi *et al.* 2005). Elle est localisée majoritairement aux **jonctions serrées tricellulaires** (Figure 8A et B) et la suppression de son expression dans la lignée épithéliale mammaire Eph4 conduit à un passage accru de macromolécules mais aussi des ions, s'accompagnant d'une désorganisation des jonctions tri- mais aussi bicellulaires (Ikenouchi *et al.* 2005). Une étude (Ikenouchi *et al.* 2008), montrant que la suppression de l'Occludine (par *knockdown* dans la lignée épithéliale MDCK II) entraîne la relocalisation de la Tricelluline aux jonctions serrées bicellulaires, a suggéré des fonctions communes à ces deux protéines, amenant à s'interroger sur le rôle spécifique des jonctions tricellulaires. Ce dernier point a été éclairci par une élégante étude permettant de discriminer la participation de la Tricelluline dans la perméabilité des jonctions bicellulaires et tricellulaires (Krug *et al.* 2009).

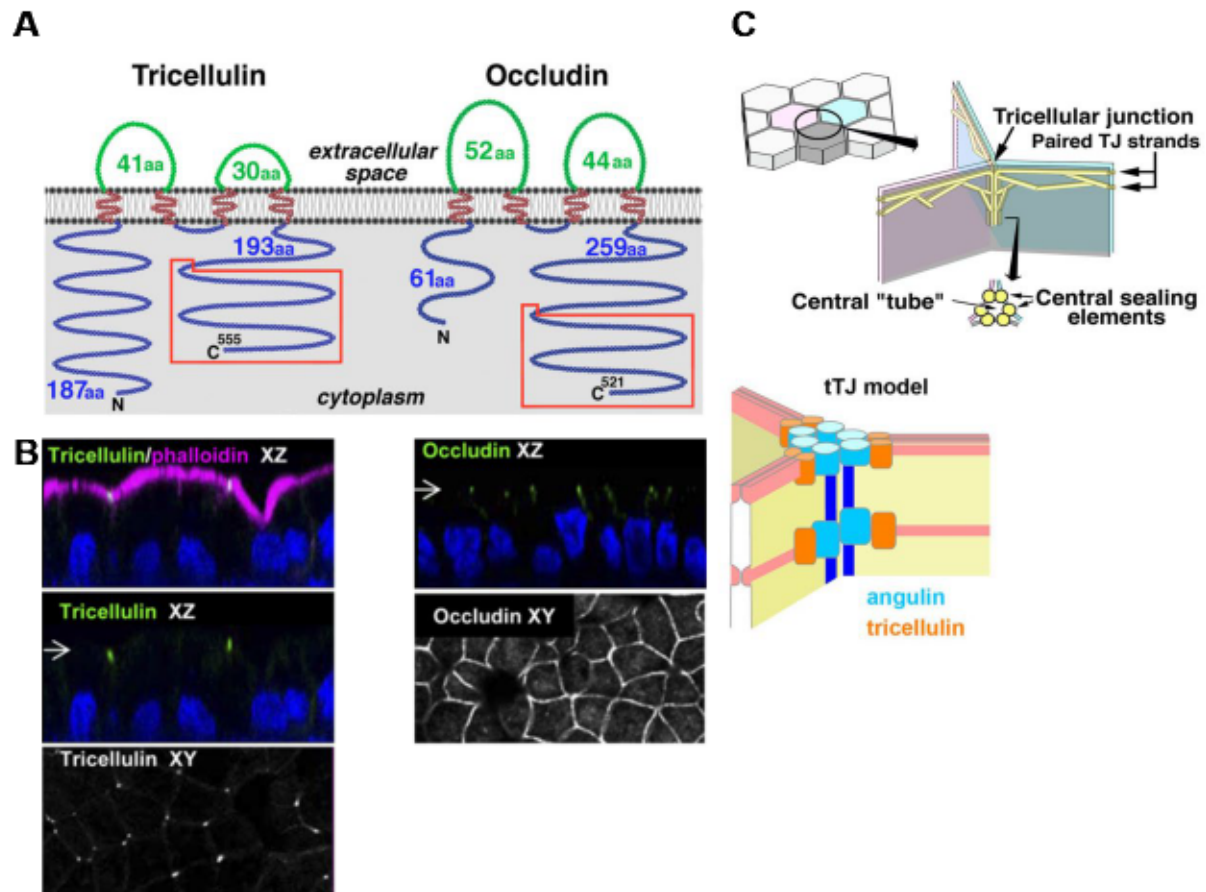


Figure 8 : Tricelluline et jonctions serrées tricellulaires. (A) Structures de la Tricelluline et de l'Occludine murines. Elles ont en commun les quatre domaines transmembranaires, le grand nombre de résidus Tyrosine et Glycine sur la première boucle extracellulaire et leurs domaines C-terminaux respectifs sont identiques à 32%. La Tricelluline a toutefois un domaine cytoplasmique N-terminal plus long (187 acides aminés) que l'Occludine (61 acides aminés) (Ikenouchi *et al.* 2005). (B) Localisation de la Tricelluline et de l'Occludine marquées par immunofluorescence dans la lignée entérocytaire Caco-2/TC7. La Tricelluline (en vert à gauche) est localisée aux jonctions serrées tricellulaires tandis que l'Occludine (en vert à droite) est observée aux jonctions serrées bicellulaires. Les flèches dans les plans XZ (vue de côté) indiquent le plan correspondant en vue du dessus (XY). La phalloïdine marque l'actine-F, ici principalement au niveau des microvillosités et les noyaux sont marqués au DAPI (en bleu) (adapté de Petit *et al.* 2012). (C) Modèle du pore central formé aux jonctions serrées tricellulaires. Ce canal d'une longueur de 1µm et d'un diamètre de 10nm est formé par la Tricelluline (en orange sur le schéma du bas) et d'autres protéines comme celles de la famille des Angulines participant à la structure de ces contacts cellule-cellule particuliers (Higashi *et al.* 2017; Ikenouchi *et al.* 2005).

Brièvement, les auteurs ont montré que la Tricelluline surexprimée aux jonctions bi- et tricellulaires diminue la perméabilité aux macromolécules et aux ions (sans spécificité de charge) avec une ultrastructure des jonctions améliorée, tandis que lorsqu'elle est localisée aux jonctions tricellulaires, la Tricelluline minimise le passage de macromolécules uniquement.

Les travaux sur cette protéine, et sur la famille des Angulines impliquées également dans la structure des contacts tricellulaires (Masuda *et al.* 2011; Higashi *et al.* 2013), ont permis de proposer un modèle dans lequel les jonctions tricellulaires forment un canal ou un pore d'un diamètre de 10nm (Figure 8C), qui est une voie de passage privilégiée des macromolécules, soulignant leur importance dans la fonction de barrière épithéliale (Furuse *et al.* 2014; Higashi *et al.* 2017; Ikenouchi *et al.* 2005; Krug *et al.* 2014).

La plaque cytosolique des jonctions serrées est un large complexe protéique dont les composants majeurs sont les protéines adaptatrices d'échafaudage faisant le lien entre protéines transmembranaires et cytosquelette (Figure 7B), grâce à leurs multiples domaines d'interaction protéines-protéines (Figure 9). Les protéines de la famille *Zonula Occludens* (ZO-1, -2, -3, classifiées dans la superfamille des MAGUKs, *Membrane-Associated Guanylate Kinase*) en sont l'exemple le plus connu. ZO-1 (Figure 9) a été la première protéine des jonctions serrées identifiée en 1986 dans divers épithélia et présentant différents variants, issus d'un épissage alternatif, avec des spécificités tissulaires (Stevenson *et al.* 1986). On peut également citer les protéines de la famille MAGI (Membrane-Associated Guanylate kinase Inverted), PATJ, (PALS1-associated Tight Junction), ou encore la Cinguline (Figure 7B), qui a la particularité de se lier aux microtubules (Citi *et al.* 2012; Yano *et al.* 2013).

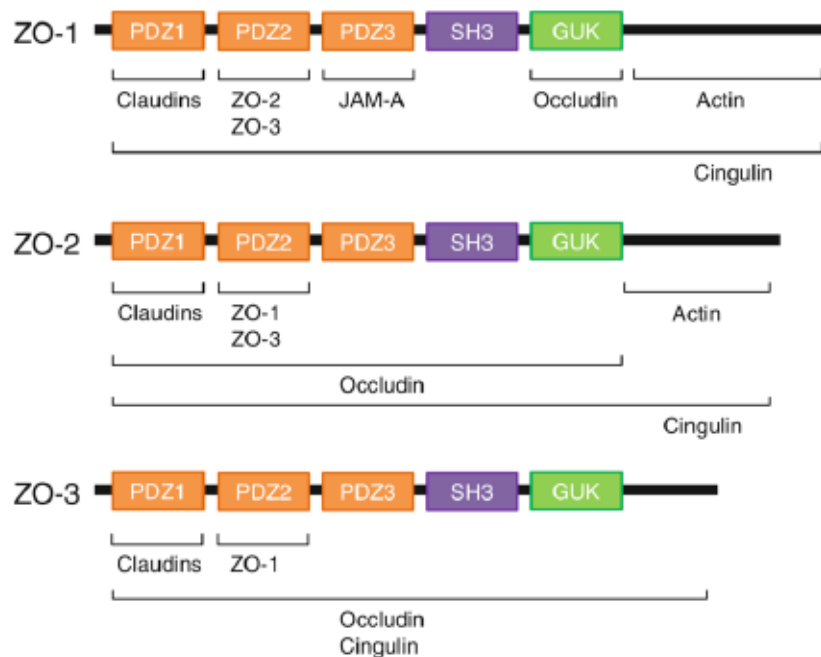


Figure 9 : Domaines d'interactions protéine-protéine de la famille des protéines adaptatrices de la plaque cytosolique Zonula Occludens ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Ces trois protéines, de la famille des MAGUKs, portent chacune trois domaines PDZ (*Post-synaptic density 95/Drosophila disc large/Zona-occludens 1*) : PDZ1 se lie aux protéines de la famille des Claudines, PDZ2 aux protéines ZO et PDZ3 à la protéine transmembranaire JAM-A (dans le cas de ZO-1). Le domaine SH3 (*Src Homology 3*) a été reporté comme interagissant avec le facteur de transcription ZONAB (Balda *et al.* 2000). Le domaine GUK (GUanylate Kinase) est conservé parmi les protéines de la famille MAGUKs ; il n'a pas d'activité enzymatique et médie l'interaction avec d'autres protéines comme l'Occludine dans le cas de ZO-1. Le domaine C-terminal est engagé dans les interactions avec le cytosquelette d'actine (pour ZO-1 et ZO-2), conférant une fonction de protéine d'échafaudage. On peut noter que les trois protéines ZO peuvent interagir avec une autre protéine adaptatrice, la Cinguline, qui lie les microtubules. (adapté de Suzuki 2013).

Le grand nombre de protéines adaptatrices et la redondance de leurs **domaines d'interactions protéine-protéine** (Figure 9), notamment au sein de la famille des ZO, ont conduit à différentes études posant la question de leur nécessité pour la formation des jonctions serrées, et d'éventuelles redondances de fonctions, bien que l'inactivation du gène de ZO-1 (Katsuno *et al.* 2008) ou du gène de ZO-2 soit létale à l'état embryonnaire (Xu *et al.* 2008). Différents travaux, utilisant un modèle de déplétion par RNA interférence de ZO-1 dans la lignée MDCK, ont généré des résultats contradictoires sur la nécessité de ZO-1 dans la formation des jonctions serrées (McNeil *et al.* 2006; Van Itallie *et al.* 2009). Une étude plus récente, dans laquelle l'expression de ZO-1 est complètement supprimée (s'affranchissant de la déplétion partielle par RNA interférence) puis réintroduite, a permis de mettre en évidence un rôle spécifique de ZO-1 dans la structure des jonctions serrées, l'organisation du cytosquelette et dans la perméabilité paracellulaire (Tokuda *et al.* 2014). Néanmoins, il a été montré *in vitro* (Umeda *et al.* 2004) et *in vivo* (Adachi *et al.* 2006) que lorsqu'une des protéines ZO est manquante, des **mécanismes compensatoires** de relocalisation des autres ZO se mettent en place, compliquant les modèles d'études mais soulignant la **robustesse de la structure des jonctions serrées**.

A noter que ZO-1 joue un rôle capital dans la formation et maturation des jonctions serrées : après la mise en place d'une jonction 'primordiale' (constituée par la E-Cadhérine et la Nectine), ZO-1 est mobilisée à cette jonction, permettant le recrutement de protéines de signalisation et la mise en place du cytosquelette (Zihni *et al.* 2016).

La plaque cytosolique des jonctions serrées comprend également de nombreuses **protéines de signalisation** (Figure 7B), recrutées par les protéines adaptatrices ou se liant directement aux protéines transmembranaires (Zihni *et al.* 2016). On retrouve aux jonctions, entre autres, des protéines kinases, des petites GTPases de la famille Rho (Cdc42, Rac1 et RhoA), des RhoGEFs mais aussi des facteurs de transcription comme ZONAB et YAP, qui sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation (Arnold *et al.* 2017; González-Mariscal *et al.* 2014) et permettent de réguler les jonctions serrées.

c. Dynamique et régulation des jonctions serrées

Loin d'être uniquement des structures d'architecture et d'échafaudage, les jonctions serrées sont hautement **dynamiques et finement régulées** et sont actuellement considérées comme des **plateformes de signalisation**. Ceci est rendu possible par la diversité des protéines de signalisation (mentionnées ci-dessus) appartenant aux jonctions serrées. Brièvement, celles-ci

permettent de mettre en place une signalisation depuis les jonctions vers le reste de la cellule et impliquent, par exemple, le facteur de transcription ZONAB (Figure 7B) régulant la prolifération cellulaire (détaillée dans la revue González-Mariscal *et al.* 2014). Réciproquement, les jonctions serrées reçoivent des signaux de la cellule conduisant à la régulation de leur composition et stabilité, de façon physiologique ou physiopathologique. Il existe deux voies possibles de contrôle des jonctions serrées : (i) la modulation de l'expression des protéines les constituant, et (ii) la régulation de leur présence à la membrane en modifiant leur trafic intracellulaire et/ou l'organisation du cytosquelette d'acto-myosine.

Divers stimuli (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2008) peuvent amener à augmenter ou diminuer l'expression de différentes protéines de jonctions, notamment *via* la voie des *Mitogen Activated Protein* (MAP) kinases, activée entre autres par les cytokines pro-inflammatoires Interféron- γ (IFN γ) et Tumor Necrosis Factor- α (TNF α), conduisant à une altération de la barrière (Patrick *et al.* 2006). Un des mécanismes les mieux décrits (Figure 10A) est la régulation positive de l'expression de la Claudine-2 (dite 'poreuse') en réponse à l'interleukine-13 (IL-13) (Weber *et al.* 2010), mais aussi à d'autres cytokines comme l'interleukine-6 et le TNF α (Mankertz *et al.* 2009; Suzuki *et al.* 2011). Bien que les effets des cytokines diffèrent sur les diverses Claudines (Prasad *et al.* 2005; Wisner *et al.* 2008), il est désormais reconnu qu'il s'agit d'un des mécanismes conduisant à la déstabilisation des jonctions serrées dans des pathologies intestinales comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

La fonction des jonctions serrées peut être également modulée en déstructurant les complexes jonctionnels. L'internalisation des protéines de jonctions serrées transmembranaires ou cytoplasmiques a été démontrée dans de nombreux modèles et met en jeu diverses voies d'internalisation (détaillées dans la revue Stamatovic *et al.* 2017). La modification de leurs interactions au sein des complexes jonctionnels et la régulation de la stabilité de ces complexes fait intervenir principalement des protéines de la famille des phosphatases (PP2A, PP1) et des kinases, notamment la grande famille des Protéines Kinases C (PKC conventionnelles, atypiques et nouvelles, impliquées dans la formation des jonctions serrées qui ne sont pas discutées ici), la kinase Src, la *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK), et la *RhO Associated protein Kinase* (ROCK). Ces protéines peuvent soit modifier directement l'état de phosphorylation des protéines de jonctions, perturbant ou stabilisant les interactions des complexes et leur localisation jonctionnelle (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2008; Van Itallie *et al.* 2018), soit agir sur le cytosquelette d'acto-myosine contractile, entraînant l'ouverture des

jonctions ou, dans les cas les plus extrêmes, l'internalisation des protéines de jonctions (Figure 10B). Cette dernière voie implique plus particulièrement la Myosine II (constituant la ceinture périjonctionnelle d'acto-myosine) dont la chaîne légère est phosphorylée par la MLCK et la famille de kinases ROCK (cible effectrice de la petite GTPase Rho), entraînant la contraction du cytosquelette (Figure 10B).

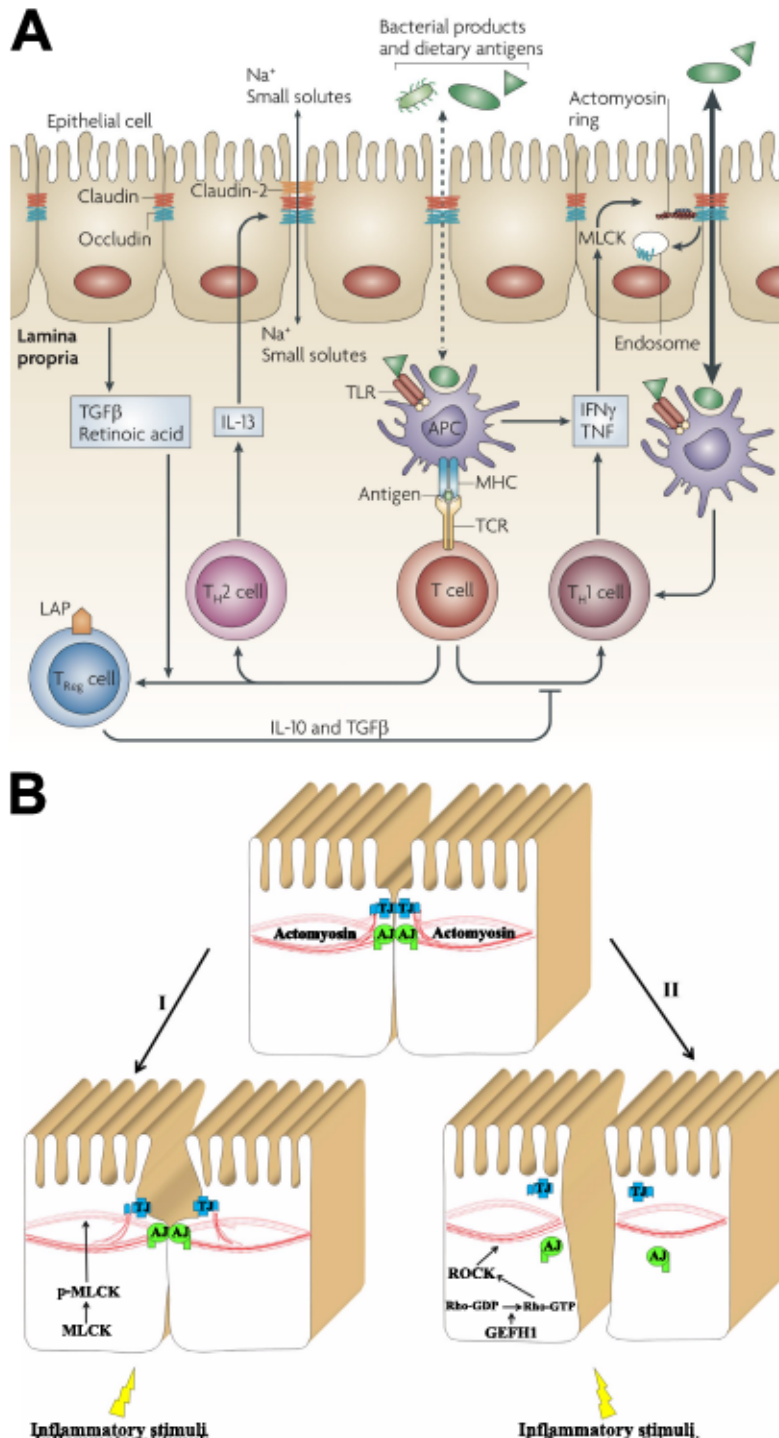


Figure 10 : Régulation des jonctions serrées et altération de la barrière épithéliale intestinale. (A) Mécanismes de déstabilisation des jonctions en réponse à une activation du système immunitaire intestinal (Turner 2009). Des fragments de paroi bactériennes ou des antigènes alimentaires traversant la barrière *via* la voie paracellulaire sont captés dans la *lamina propria* par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui peuvent activer la différenciation des lymphocytes T-helper 1 ou 2 (T_H1, T_H2). Ces derniers et les APCs, libèrent les cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF α , qui, par l'activation de la MLCK, entraîne une déstabilisation des jonctions serrées et donc un passage accru de molécules luminales. De plus, les T_H2 sécrètent de l'IL-13 qui est connue pour induire l'augmentation de l'expression de la Claudine-2, dite 'pore-forming', menant aussi à une barrière épithéliale moins sélective. Ces deux voies contribuent à mettre en place un cercle vicieux entre perméabilité augmentée et inflammation. Cette dernière est normalement régulée, en conditions physiologiques, par le rôle des lymphocytes T régulateurs (T_{Reg}) *via* l'IL-10 et le TGF β . (B) Voies de signalisation activées dans un contexte inflammatoire conduisant au remodelage du cytosquelette jonctionnel d'acto-myosine. La première voie implique l'activation de la MLCK (par sa phosphorylation), qui phosphoryle la chaîne légère de la Myosine II, conduisant à une contraction modeste de la ceinture d'actine et à une ouverture transitoire de l'espace paracellulaire. La deuxième voie fait intervenir l'activation de ROCK (par la petite GTPase Rho) qui, agissant aussi sur la

Myosine II, conduit à un remodelage important du cytosquelette jonctionnel, entraînant l'internalisation des protéines de jonctions, et donc une modification de la perméabilité de façon moins réversible. Notons que ces voies sont ici schématisées indépendamment mais qu'il existe des mécanismes les faisant intervenir simultanément (adapté de Ivanov *et al.* 2010).

Ce mécanisme de régulation intervient en **conditions physiologiques**, notamment en réponse à l'activation du co-transporteur Sodium-Glucose induisant l'activation de la MLCK et à une **augmentation transitoire** de l'absorption paracellulaire de nutriments et solutés (Turner 2000). Mais ce processus, lorsqu'il est suractivé, conduit à une **dérégulation physiopathologique** des jonctions serrées et une perte de contrôle de la fonction de barrière intestinale. Ceci a été démontré *in vitro* et *in vivo* en réponse à des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β (Al-Sadi *et al.* 2012; Al-Sadi *et al.* 2007), le TNF α et l'IFN γ (Su *et al.* 2013; Clayburgh *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005) et la mise en évidence de l'implication directe de la MLCK (Shen *et al.* 2006). L'augmentation de l'expression et l'activation de la kinase ROCK en réponse à l'IFN γ conduit également à l'internalisation de l'Occludine (Utech *et al.* 2005) confirmant le rôle que peut jouer cette kinase dans le désassemblage des jonctions intercellulaires (Ivanov *et al.* 2009; Samarin *et al.* 2007).

Ainsi, la mise en évidence du rôle de **stimuli pro-inflammatoires** tels que les cytokines dans la déstabilisation des jonctions serrées a permis de mieux comprendre les mécanismes de leur dérégulation observée dans des pathologies associées à un défaut de barrière intestinale, notamment les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Dans ces pathologies, une activation excessive de la réponse immunitaire de la muqueuse, qui en retour altère les jonctions, met ainsi en place un cercle vicieux (Figure 10A).

v. Pathologies humaines, barrière intestinale et jonctions intercellulaires

a. **Jonctions intercellulaires et agents infectieux**

Les jonctions serrées constituent une porte de défense des épithélia mais peuvent également être utilisées comme **voie d'entrée**, notamment par certains virus ou pathogènes. Ceci a été amplement documenté (Roxas *et al.* 2018b; Zihni *et al.* 2014; Huber 2020) et nous l'illustrerons par quelques exemples. Le virus de l'hépatite C (qui n'est pas un virus intestinal) utilise comme récepteur certaines Claudines (Evans *et al.* 2007; Zheng *et al.* 2007) ainsi que l'Occludine (Liu *et al.* 2009; Ploss *et al.* 2009). Les pathogènes bactériens qui ciblent les jonctions intercellulaires peuvent avoir recours à trois stratégies (Huber 2020) : (i) déstabiliser le complexe apical jonctionnel en ciblant le cytosquelette, (ii) détourner leurs voies de signalisation, (iii) altérer directement les protéines adhésives des jonctions.

La bactérie pathogène gastrique *Helicobacter pylori* altère la structure des jonctions serrées *in vitro* (Amieva *et al.* 2003) et *in vivo* (Suzuki *et al.* 2002). De nombreux pathogènes intestinaux

altèrent la fonction de barrière intestinale en désorganisant les jonctions intercellulaires. L'infection de cellules épithéliales intestinales T84 par *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) conduit à la déphosphorylation de l'Occludine et à la délocalisation de ZO-1, favorisant la translocation de cette bactérie, mais également la migration trans-épithéliale de polynucléaires neutrophiles (Kohler *et al.* 2007). Une étude a montré que la bactérie *Shigella flexneri* utilise la Tricelluline et les jonctions serrées tricellulaires comme point d'entrée pour sa dissémination de cellule à cellule (Fukumatsu *et al.* 2012). La bactérie pathogène *Clostridium difficile* produit deux toxines (TcdA et TCDB) qui conduisent à l'internalisation de l'Occludine, ZO-1 et ZO-2 (et la perte de leur interactions) suite au remodelage du cytosquelette de F-actine (sans affecter la E-Cadhérine) (Nusrat *et al.* 2001). Le pathogène *Vibrio cholerae* possède deux toxines, ZOT (pour *Zonula Occludens Toxin*) et l'haemagglutinine/protéase (HA/P), qui augmentent la perméabilité paracellulaire et affectent les protéines de jonctions ZO-1 et l'Occludine (Fasano *et al.* 1991; Wu *et al.* 2000).

Enfin, de nombreuses études ont porté sur les différentes souches entéropathogènes d'*Escherichia coli* (EPEC) (présentées dans la revue Kaper *et al.* 2004). Roxas *et al.* ont rapporté une délocalisation de l'Occludine et des Claudine-2 et -3 et une augmentation de la perméabilité intestinale suite à l'infection par une souche entérohémorragique pathogène murine (Roxas *et al.* 2010). L'infection des cellules T84 par une souche entéroagrégate conduit à la délocalisation de l'Occludine et ZO-1 et une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Strauman *et al.* 2010). Diverses études *in vitro* ont montré que des souches EPEC humaines déstabilisent les jonctions serrées par la déphosphorylation de l'Occludine et sa perte d'interaction avec les complexes jonctionnels (Simonovic *et al.* 2000), aboutissant à des brins de jonctions serrées aberrants (Muza-Moons *et al.* 2004). Le rôle délétère de la souche EPEC humaine sur la barrière intestinale et les jonctions serrées, notamment l'Occludine, a été confirmé *in vivo* (grâce à un modèle d'infection de la souris par une souche EPEC humaine) (Shifflett *et al.* 2005). Il a également été montré qu'EPEC induit le désassemblage des desmosomes (Roxas *et al.* 2018a). Différentes souches adhérente-invasives d'*Escherichia coli* (AIEC) sont également capable de perturber la localisation de ZO-1 et de la protéine transmembranaire E-Cadhérine (Sasaki *et al.* 2007; Wine *et al.* 2009).

On peut ajouter que la bactérie pathogène humaine, véhiculée par la nourriture, *Listeria monocytogenes* entre dans l'organisme en infectant les cellules épithéliales grâce à son interaction spécifique avec la E-cadhérine, qui lui sert de récepteur avant son internalisation et sa propagation de cellule en cellule (Lecuit *et al.* 1999; Lecuit *et al.* 2001).

b. Jonctions serrées et mutations héréditaires

Chez l'Homme, il existe plusieurs mutations dans les gènes de différentes protéines de jonctions responsables de **maladies héréditaires**. Les mutations dans les gènes codant respectivement les Claudines-16 et -19 causent une forme familiale d'hypomagnésémie, hypercalciurie et néphrocalcinose (soulignant le rôle de ces protéines dans la recapture des ions dans le rein), tandis que des mutations dans les gènes codant la Claudine-14 ou la Tricelluline (MARVELD2) sont responsables de surdité non-syndromique (Choi *et al.* 2017). Ainsi, à l'exception d'une forme néonatale d'ichtyose (et de cholangite sclérosante) chez les individus porteurs d'une mutation du gène codant la Claudine-1, aucune des mutations mentionnées plus haut n'est associée à un défaut de barrière épithéliale. En revanche, une expression modifiée de diverses protéines de jonctions serrées a été reportée dans des pathologies de la peau comme le psoriasis, la dermatite et l'ichtyose (Choi *et al.* 2017).

Nous verrons ultérieurement que des polymorphismes de quelques gènes codant des protéines jonctionnelles ou impliquées dans la stabilité des jonctions sont associés aux MICI.

c. Perméabilité intestinale, jonctions serrées et pathologies humaines

De nombreuses pathologies sont associées à un défaut de perméabilité intestinale (Odenwald *et al.* 2013). On peut citer des pathologies non digestives comme la maladie du greffon contre l'hôte (Johansson *et al.* 2007) ou bien le VIH/SIDA (Sharpstone *et al.* 1999). Ces pathologies sont corrélées à un défaut de perméabilité sans lien clair de causalité, mais ces observations chez l'Homme sont cohérentes avec les résultats d'études réalisées dans des modèles animaux (Odenwald *et al.* 2013).

Dans le cas du diabète de type-1, une perméabilité augmentée précède le développement de la maladie (Bosi *et al.* 2006). La fonction de barrière intestinale a fait l'objet d'une attention particulière dans l'obésité et les maladies métaboliques comme le diabète de type-2. Ces maladies complexes s'accompagnent d'une inflammation systémique de bas-grade et d'une inflammation du tissu adipeux et du foie (Ganeshan *et al.* 2014) mais aussi, comme montré par notre équipe, d'une modification des propriétés du système immunitaire inné et adaptatif de la muqueuse intestinale (notamment des lymphocytes intra-épithéliaux) conduisant à une altération de la fonction entérocytaire (Monteiro-Sepulveda *et al.* 2015).

Une augmentation de perméabilité intestinale associée à une diminution des taux d'ARNm de l'Occludine et ZO-1 a été montrée par une étude pionnière dans un modèle murin de régime

obésogène-diabétogène (Cani *et al.* 2008). Les auteurs ont également mis en évidence une corrélation entre endotoxémie (concentration de LPS dans le sang) et inflammation, et montré que ces effets étaient abolis par la prise d'antibiotiques, suggérant un rôle du changement de composition du microbiote survenant suite au régime. D'autres études chez le rongeur ont confirmé l'altération de la barrière dans les modèles d'obésité (Araujo *et al.* 2017). Notamment, un défaut de la barrière chimique et du mucus ainsi qu'une perméabilité iléale augmentée ont été reportés chez le rat soumis à un régime obésogène (Guerville *et al.* 2017). De plus, une augmentation de la perméabilité intestinale iléale, réversible, apparaît dès une semaine de régime hyperlipidique chez le rat (ainsi que des modifications de la composition bactérienne), suggérant que l'altération de la barrière est un événement précoce dans la mise en place de l'obésité (Hamilton *et al.* 2015).

Il a été proposé qu'un défaut de barrière intestinale puisse être à l'origine du passage de LPS dans le compartiment intérieur (endotoxémie), conduisant à une inflammation tissulaire et systémique (Cani *et al.* 2007; Le Gall *et al.* 2018). Cependant, seulement quelques études, réalisées sur des cohortes de petite taille, ont corroboré une augmentation de perméabilité intestinale (estimée *via* la mesure de Lactitol-Mannitol) chez les sujets obèses humains (Damms-Machado *et al.* 2017; Teixeira *et al.* 2012).

Notre équipe a pu montrer pour la première fois, en mesurant la perméabilité jéjunale *ex vivo* en chambres de Ussing, qu'il existe chez les sujets obèses, d'une part, un défaut subtil de barrière, qui peut être exacerbé par un challenge lipidique, et, d'autre part, une perte de l'Occludine et la Tricelluline aux jonctions serrées (Genser *et al.* 2018 en annexe), confirmant ainsi l'implication d'un défaut de la barrière intestinale dans cette pathologie métabolique complexe.

Une augmentation de l'expression de la MLCK et des Claudines-2 et -15 et une diminution de celle de la Claudine-7 ont été observées dans le syndrome de l'intestin irritable et la maladie cœliaque (Choi *et al.* 2017), pathologies pour lesquelles un défaut de perméabilité intestinale est suggéré par quelques données (Dunlop *et al.* 2006; Smecuol *et al.* 1997).

Les MICI sont des pathologies pour lesquelles un défaut de la fonction de barrière intestinale a été clairement décrit, avec des altérations de tous les acteurs de la barrière, que nous allons aborder plus en détail dans le chapitre suivant.

II. DEFAT DE BARRIERE & PHYSIOPATHOLOGIES INTESTINALES : LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

A. PRESENTATION GENERALE ET EPIDEMIOLOGIE DES MICI

Les **Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)** regroupent principalement la **Maladie de Crohn (MC)** et la **Rectocolite Hémorragique (RCH)**. Ces maladies, caractérisées par une inflammation chronique idiopathique de l'intestin, résultent d'interactions complexes entre facteurs environnementaux et luminaux et une réponse immunitaire inappropriée chez des individus génétiquement prédisposés (Xavier *et al.* 2007). Les MICI sont des pathologies récentes, ayant émergé dans les pays occidentaux (Europe, Amérique du Nord et Océanie) durant le XXe siècle, à l'ère de l'industrialisation et affectent actuellement plus de 0.3% de la population de ces pays (Tableau 1) (Ng *et al.* 2017). Elles sont en passe de devenir un problème de santé mondial, étant donné l'accélération de l'incidence observée depuis les années 1990 dans les pays nouvellement industrialisés (Kaplan 2015) (Tableau 1).

	Incidence moyenne (minimum-maximum) pour 100 000 habitant/année)		Prévalence moyenne (minimum-maximum) pour 100 000 habitants)	
	MC	RCH	MC	RCH
Amérique du Nord	15.05 (6.3-23.8)	15.95 (8.8-23.1)	207.4 (96.3-318.5)	213.05 (139.8-286.3)
Europe de l'Ouest	7.5 (0.4-14.6)	6.4 (0.97-11.9)	100.8 (1.5-200)	171.2 (2.42-340)
Europe du Nord	5.7 (0-11.4)	29.8 (1.7-57.9)	143 (24-262)	706.5 (908-505)
Europe du Sud	8.2 (0.95-15.4)	7.4 (3.3-11.47)	70.9 (4.5-137.2)	74.2 (14.5-133.9)
Europe de l'Ouest	6.2 (1.85-10.5)	9.6 (1.9-17.2)	175.1 (28.2-322)	227.6 (43.1-412)
Asie de l'Est	1.6 (0.06-3.2)	2.5 (0.42-4.6)	9.8 (1.05-18.6)	30.9 (4.6-57.3)
Asie du Sud-Est	0.3 (0.14-0.4)	0.4 (0.15-0.7)	4.4 (2.2-6.7)	6.7
Asie du Sud	1.9 (0.09-3.9)	3.4 (0.7-6)	1.2	24.8 (5.3-44.3)
Asie de l'Ouest	4.7 (0.9-8.4)	3.7 (0.8-6.5)	51.9 (50.6-53.1)	55.6 (4.9-106.2)
Amérique du Sud	1.75 (0-3.5)	3.5 (0.2-6.8)	21.2 (0.9-41.4)	24.5 (4.7-44.3)
Océanie	21.2 (13-29.3)	12.4 (7.3-17.4)	176.3 (155.2-197.3)	170.5 (145-196)
Afrique	5.9	3.3	19	10.6

Tableau 1 : Incidence et prévalence de la Maladie de Crohn (MC) et RectoColite Hémorragique (RCH) par région du monde, d'après des données d'études réalisées entre 1990 et 2016 (Ng *et al.* 2017).

Ces deux maladies, qui ne sont pas mortelles mais qui affectent sérieusement la qualité de vie des sujets atteints, se distinguent par des phénotypes différents (Figure 11).

Brièvement, la MC, dont le pic d'âge de développement se situe entre 20 et 30 ans (Cosnes *et al.* 2011), présente des symptômes variables, les plus fréquents étant un amaigrissement, des douleurs abdominales et une diarrhée chronique. La MC est caractérisée par la survenue de lésions inflammatoires locales et discontinues, quel que soit le segment du tractus gastro-intestinal (de la bouche à l'anus) (Figure 11). Bien qu'on retrouve le plus souvent ces lésions

dans l'iléon distal, le colon ou bien les deux, 10 à 15% des patients présentent des lésions dans des segments plus proximaux du tube digestif (Cosnes *et al.* 2011). D'un point de vue histologique, ces lésions, dites **transmurales**, affectent l'intégralité de la paroi du tube digestif et peuvent conduire à des complications de types fistules, abcès et sténoses (Figure 11), qui peuvent nécessiter un recours à une chirurgie de résection intestinale (Baumgart *et al.* 2012). De plus, environ un tiers des sujets atteints développent au cours de la maladie des **manifestations extra-digestives**, les plus fréquentes étant articulaires et osseuses, cutanées (érythème, pyoderma, psoriasis), buccales (ulcères aphteux) et oculaires (uvéïte).

Les symptômes cliniques classiques de la RCH, dont le pic d'âge de développement est entre 30 et 40 ans, sont des douleurs abdominales, une diarrhée sanglante (avec mucus et sang) et/ou des saignements rectaux ainsi que de la fièvre dans les cas sévères (Ordás *et al.* 2012).

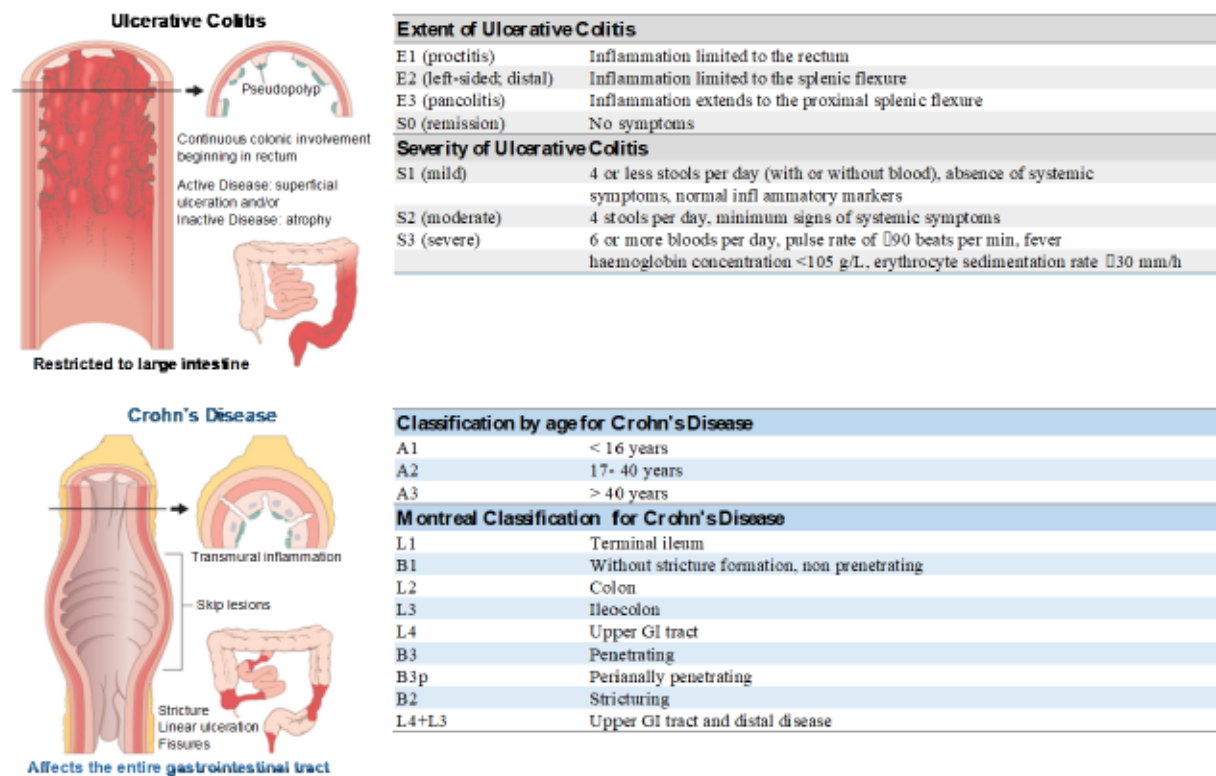


Figure 11 : Comparaison des phénotypes des MICI - RectoColite Hémorragique (RCH, *ulcerative colitis*) et Maladie de Crohn (MC, *Crohn's disease*). L'inflammation dans la RCH (en haut à gauche) débute au niveau du rectum et s'étend dans le colon descendant, de façon continue. Au niveau histologique, seules la muqueuse et sous-muqueuse sont affectées. La MC (en bas à gauche) peut affecter n'importe quel segment du tube digestif (de la bouche à l'anus), de façon discontinue avec des segments sains. L'inflammation atteint toute la paroi du tube digestif et est souvent associée à des complications telles que les sténoses (*strictures*), ulcérations, fistules et granulomes. (adapté de <http://geoffreyve-reedlife.blogspot.com/>). Classification diagnostique de la RCH (en haut à droite) et MC (en bas à droite). La RCH est classifiée selon la répartition et l'étendue (*extent*) des lésions histologiques ainsi que par la sévérité de paramètres cliniques tels que les selles (et diarrhées hémorragiques), l'inflammation systémique, la fièvre (adapté de Ordás *et al.* 2012). La sévérité de la MC est estimée selon l'âge de survenue de la maladie et selon la classification de Montréal, sur la base de la localisation anatomique des lésions et de leurs caractéristiques histologiques (adapté de Baumgart *et al.* 2012).

Elle se présente par une inflammation chronique débutant au niveau du rectum et qui peut plus ou moins s'étendre de façon ascendante le long du colon sigmoïde et descendant (Figure 11). L'étendue des lésions permet de classer la maladie en 3 phénotypes et la sévérité de la maladie dépend des signes cliniques (Figure 11). Contrairement à la MC, les lésions histologiques causées par la RCH sont généralement superficielles et se limitent à la muqueuse et sous-muqueuse de la paroi intestinale (Figure 11).

Une des complications des MICI est le risque accru de développement d'un cancer en territoire inflammatoire atteint par la maladie, soit de l'intestin pour la maladie de Crohn ou colo-rectal chez les MICI coliques (Canavan *et al.* 2006).

B. ETIOLOGIE DES MICI

Les MICI sont des maladies multifactorielles dont le développement résulte d'interactions complexes entre facteurs environnementaux, facteurs luminaux, notamment le microbiote, et une réponse immunitaire inappropriée chez des individus présentant des prédispositions génétiques. Malgré les avancées dans la découverte de gènes de prédispositions aux MICI, dans la compréhension du rôle du microbiote et de ses interactions avec le système immunitaire intestinal, l'étiologie des MICI reste encore mal comprise.

i. Facteurs génétiques

La participation de 'facteurs héréditaires' dans la physiopathologie des MICI est d'abord venue d'observations d'agrégations familiales.

Une étude en population de la région de Copenhague a montré que les parents au premier degré de sujets atteints de RCH ou MC présentaient un risque dix fois plus important de développer l'une de ces maladies (Orholm *et al.* 1991). Différents travaux sur des populations de jumeaux ont permis d'étudier la participation de la génétique (Moller *et al.* 2016; Tysk *et al.* 1988; M. Orholm 2000) : une étude allemande a évalué que 35% des jumeaux homozygotes étaient concordants pour la MC tandis que seulement 16% des paires de jumeaux homozygotes étaient concordantes pour la RCH, suggérant une contribution plus importante des facteurs environnementaux dans la RCH (Spehlmann *et al.* 2008).

Depuis une dizaine d'années, des études de type *Genome Wide Association Studies* (GWAS) ont permis d'identifier des loci de susceptibilité aux MICI (Anderson *et al.* 2011; Franke *et al.* 2010). En particulier, une méta-analyse de 2012 a permis d'identifier 163 loci associés aux

MICI, dont 110 communs aux deux pathologies, 30 uniques à la MC et 23 à la RCH (Jostins *et al.* 2012). Une étude plus récente, réalisée sur une cohorte européenne incluant des sujets d'origine asiatique, a incrémenté le nombre de loci jusqu'à 200 mais a également souligné des disparités ethniques (Liu *et al.* 2015a), à prendre en considération dans les années futures étant donné l'émergence des MICI dans les pays nouvellement industrialisés (Kaplan 2015).

Ces études ont permis de montrer que les gènes associés aux MICI sont impliqués dans diverses fonctions et processus cellulaires participant à l'**homéostasie intestinale** (Figure 12A). Les gènes identifiés sont impliqués dans des voies faisant intervenir l'activation des lymphocytes, la tolérance immunitaire, l'autophagie et le stress du réticulum endoplasmique, la génération d'espèces réactives de l'oxygène, la restitution épithéliale, les défenses innées et la fonction de barrière épithéliale (Figure 12A).

Ces différents loci semblent impliqués dans plusieurs de ces processus (Figure 12B) (Khor *et al.* 2011). Le premier polymorphisme découvert associé à la MC est celui du gène *NOD2* (ou *CARD15*) qui code pour la *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2* (NOD2). Celle-ci reconnaît dans le cytoplasme le motif Muramyl DiPeptide (MDP) des peptidoglycanes des bactéries Gram-positives et peut ainsi moduler la réponse immunitaire innée et adaptative, notamment en induisant l'autophagie (Shaw *et al.* 2011). Le gène *CARD9* est également associé aux MICI et code pour la protéine *CAspase Recruitment Domain-containing protein 9* qui intègre les signaux de divers PRRs pour déclencher une réponse pro- ou anti-inflammatoire (Figure 12B). Un variant du gène *ATG16L1*, dont la protéine est impliquée dans la formation d'autophagosomes et participe à l'exocytose des granules des cellules de Paneth, ainsi que le locus du gène *IRGM* (impliqué dans l'autophagie de pathogènes intracellulaires), sont également associés à la MC (mais pas à la RCH), soulignant le rôle d'une part de l'**autophagie**, et, d'autre part, des **mécanismes de défenses innées** dans cette maladie. On peut mentionner les polymorphismes génétiques, identifiés à la fois chez les sujets atteints de MC et de RCH, de différents gènes impliqués dans la réponse immunitaire dont *IL23R* codant le récepteur de l'IL-23 et *IL10* codant la cytokine immuno-régulatrice du même nom.

Le *UK IBD Consortium* a révélé en 2009 (Consortium *et al.* 2009) l'association de la RCH avec les loci contenant des gènes impliqués dans la **barrière intestinale**, dont le gène codant le facteur de transcription *Hepatocyte Nuclear Factor 4a* (**HNF4a**), le loci du gène *LAMB1* codant la sous-unité $\beta 1$ de la laminine (protéine de la lame basale) et *CDH1*, codant la E-Cadhérine, dont l'expression et la localisation avait déjà reportées comme étant perturbées dans les zones lésées chez les sujets atteints de MICI (Karayiannakis *et al.* 1998). Une autre étude de 2009 a identifié un SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide, *Single Nucleotide Polymorphism*) de

CDH1 associé à la MC, qui semble conduire à une forme tronquée de la E-Cadhérine présentant un défaut de localisation membranaire (Muise *et al.* 2009). De plus, une étude récente a montré que le variant *333F à risque du gène *C1orf106* conduit à la déstabilisation des jonctions adhérentes et au défaut de barrière subséquent (Mohan *et al.* 2018). Ces derniers éléments soulignent l'implication de la barrière intestinale dans les MICI.

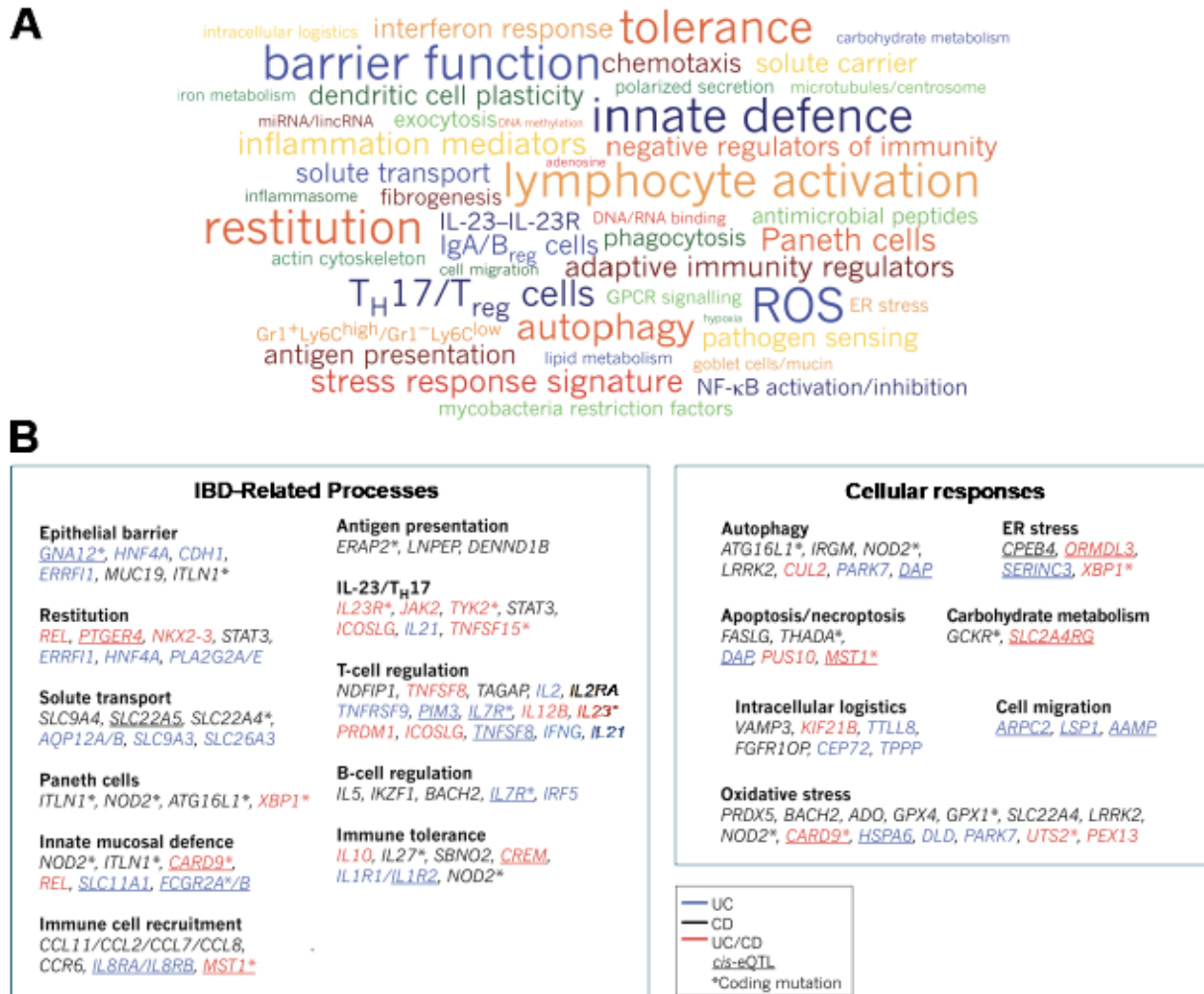


Figure 12 : Prédipositions génétiques des MICI (A) Termes récurrents illustrant les processus cellulaires impliqués par au moins trois gènes identifiés comme loci de susceptibilité aux MICI. La taille de la police est représentative du nombre de gènes impliqués. Les gènes identifiés sont impliqués dans des voies faisant intervenir l'activation des lymphocytes, la tolérance immunitaire, l'autophagie et le stress du réticulum endoplasmique (*Endoplasmic Reticulum, ER, stress*), la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*), la restitution épithéliale (processus correspondant au re-scèlement de la barrière épithéliale après rupture de celle-ci), les défenses innées et la fonction de barrière épithéliale. Ces fonctions participent à l'homéostasie intestinale. Acronymes : Cellules B régulatrices (*Breg cells*) ; Récepteur Couplé aux Protéines G (*GPCR*) ; Interleukine (IL) ; large ARN non codant intergénomiques (*lincRNA*), micro ARN (*miRNA*) ; micro ARN non codant (*ncRNA*) ; Nuclear Factor-κB (NF-κB) ; lymphocytes T-Helper 17 (*T_H17 cells*) ; lymphocytes T régulateurs (*T_{reg} cells*). (B) Classification des gènes dont des SNPs ont été associés aux MICI selon leur fonction dans le maintien de l'homéostasie intestinale. La couleur indique si les loci à risque sont associés à la rectocolite hémorragique (UC, en bleu) ou la maladie de Crohn (CD, en noir) ou les deux (UC/CD en rouge). Les astérisques indiquent les gènes dont les loci identifiés sont porteurs de mutations codantes. Les gènes soulignés sont classés comme cis-eQTL (pour *cis-Expression quantitative trait loci*, locus de caractères quantitatifs), dont la variation corrèle quantitativement avec l'expression du trait phénotypique (adapté de Khor *et al.* 2011).

ii. Facteurs environnementaux

Les études sur les populations de jumeaux citées précédemment et montrant des faibles taux de concordance ont suggéré une **contribution non négligeable des facteurs environnementaux** dans le développement de la RCH et, dans une moindre mesure, de la MC (Moller *et al.* 2016; Spehlmann *et al.* 2008; Tysk *et al.* 1988 ; M. Orholm 2000). De plus, l'émergence des MICI dans les pays non occidentaux depuis leur industrialisation relativement récente témoigne de l'impact du **mode de vie occidental** sur le risque de développer ces pathologies (Kaplan 2015). Ceci est corroboré par une étude montrant que l'incidence des MICI dans une population originaire d'une zone de faible incidence migrant vers une zone de forte incidence atteint celle du pays d'accueil après seulement une génération (Benchimol *et al.* 2015). L'étude de l'impact des facteurs environnementaux sur le risque de survenue des MICI est compliquée : différents facteurs sont souvent liés et ces données épidémiologiques permettent uniquement de mettre en évidence des **corrélations sans lien clair de causalité**.

Cependant, il est désormais admis que le **tabac** impacte, de façon opposée, le risque de développer l'une des deux MICI : le tabac augmente le risque de développer la MC mais diminue ce risque pour la RCH (Bastida *et al.* 2011; Cosnes *et al.* 2001; Piovani *et al.* 2019). De même, l'**appendicectomie** est un autre facteur avéré qui influe de façon opposée sur les deux pathologies : une étude montre que l'appendicectomie prévient du risque de développer une RCH, mais ce seulement si elle est effectuée avant 20 ans (Andersson *et al.* 2001) tandis qu'il semble que cette opération augmente le risque de survenue de la MC, bien ce risque soit atténué 5 ans après la chirurgie (Kaplan *et al.* 2008; Piovani *et al.* 2019).

D'autres facteurs ont été évoqués sans lien de causalité démontré. Il semble que l'allaitement de l'enfant ait un effet protecteur sur le risque de survenue des deux MICI. Les individus très actifs physiquement auraient un risque moindre de développer une MC mais pas une RCH (Piovani *et al.* 2019). Une revue de la littérature a reporté que la consommation élevée de graisses, acides gras polyinsaturés et oméga-6, et de viande étaient associée avec un risque accru de développement de MC et RCH ; la consommation élevée, d'une part, de fibres et fruits, et, d'autre part, de légumes, semble diminuer respectivement le risque de survenue de la MC et de la RCH (Hou *et al.* 2011). De plus, la consommation croissante d'additifs alimentaires dans le régime occidental est proposée par certains auteurs comme un facteur à risque, notamment *via* un rôle délétère sur la barrière intestinale (Lerner *et al.* 2015). Le mode de vie rural semble prévenir du risque de développer l'une ou l'autre des MICI, argument en faveur de la mise en cause d'un excès d'hygiène dans le mode de vie occidental (Piovani *et al.* 2019).

iii. Perturbation de la fonction de barrière dans les MICI

La physiopathologie des MICI reste encore mal comprise à ce jour, étant donnée la complexité des interactions mises en jeu au sein de l'intestin, notamment entre microbiote et système immunitaire. A l'interface entre ces deux composantes, se trouve la **barrière intestinale**, qui est dérégulée dans les MICI (Figure 13).

a. **Modifications de la barrière biochimique dans les MICI**

La première ligne de défense rencontrée par les micro-organismes présents dans la lumière intestinale est la barrière chimique assurée par les peptides antimicrobiens (AMPs).

De nombreuses modifications de l'expression des différentes Défensines ont été observées dans les MICI (Tableau 2). Une étude reporte une diminution des taux d'ARNm des α -Défensines humaines 5 (HD-5) et HD-6 (mais pas d'autres AMPs), spécifiquement dans des biopsies iléales de sujets atteints de MC, ainsi qu'une activité antimicrobienne moindre que les contrôles, indépendamment de l'état inflammatoire (Wehkamp *et al.* 2005). HD-5 est exprimée par des cellules de Paneth métaplasiques, dans les cryptes du colon de sujets atteints de RCH et MC, tandis que la présence de ces cellules et l'expression de HD-5 est restreinte à l'iléon chez les sujets sains (Cunliffe *et al.* 2001). De plus, il a été montré que l'expression HD5 est augmentée dans les zones inflammées, par rapport aux zones sans inflammation, dans le colon de sujets MC non porteurs de mutations à risque du gène *NOD2*, tandis que cette différence n'est pas observée dans les biopsies coliques de sujets atteints de MC porteurs de mutations *NOD2* (Wehkamp *et al.* 2004). Des modifications de l'expression des AMPs de la famille des β -Défensines (HBD) sont également observées dans les MICI. L'expression de la β -Défensine 2 humaine (HBD-2), normalement peu présente dans le colon sain, est détectée dans plus de biopsies de sujets atteints de RCH et, dans une moindre mesure, de MC par rapport aux sujets sains, suggérant une induction de son expression dans un contexte inflammatoire (Wehkamp *et al.* 2002). Une augmentation de l'expression de HBD-3 a été montrée chez les sujets atteints de RCH, mais pas de MC (Wehkamp *et al.* 2003).

Ainsi, les variations de profils d'expression des différentes Défensines (récapitulées dans le Tableau 2) semblent dépendre de la pathologie (RCH ou MC) et du segment concerné (iléon ou colon), ainsi que du contexte génétique, mais dénotent d'une **réponse et de défenses immunitaires innées modifiées dans les MICI** (Figure 13).

	Intestin grêle		Colon		Référence
	MC	RCH	MC	RCH	
HD-5	Diminuée (ARNm)	ND	ND	ND	(Wehkamp <i>et al.</i> 2002)
	Pas de modification	Pas de modification	Augmentée (protéine)	Augmentée (protéine)	(Cunliffe <i>et al.</i> 2001)
	ND	ND	Augmentée (ARNm) (zones inflammées, mutation <i>NOD2</i>)	ND	(Wehkamp <i>et al.</i> 2004)
HD-6	Diminuée (ARNm)	ND	ND	ND	(Wehkamp <i>et al.</i> 2005)
HBD-2	ND	ND	Augmentée (ARNm)	Augmentée (ARNm)	(Wehkamp <i>et al.</i> 2002)
HBD-3	ND	ND	Pas de modification	Augmentée (ARNm)	(Wehkamp <i>et al.</i> 2003)

Tableau 2 : Vue d'ensemble des modifications des Défensines dans les MICI. (ND : Non documenté)

b. Modifications de la couche de mucus dans les MICI

La couche de mucus, composante capitale de la barrière physique intestinale (mais aussi réservoir d'AMPs et d'IgA), est également altérée dans les MICI (Figure 13), et plus particulièrement dans la RCH (Chen *et al.* 2014). En 1994, une étude montre une perte de couche de mucus au niveau de la muqueuse inflammée dans des biopsies de sujets atteints de RCH (de façon proportionnelle au degré d'inflammation), mais pas chez les sujets atteints de MC, présentant même une épaisseur de mucus supérieure aux contrôles (Pullan *et al.* 1994). L'épaisseur de la couche décroît avec la sévérité de la RCH et le mucus est infiltré par des bactéries et leucocytes (Swidsinski *et al.* 2007). Ceci est confirmé par une étude plus récente montrant que la couche de mucus dans les biopsies coliques de sujets atteints de RCH en poussée est amplement pénétrée par des bactéries, contrairement à la plupart des sujets en rémission, ou tous les contrôles (Johansson *et al.* 2014).

La teneur en phospholipides du mucus est réduite, et sa composition modifiée, chez les sujets malades de RCH mais pas de MC ni sains (Braun *et al.* 2009). De plus, la longueur des résidus O-glycanes de Muc2 est réduite chez les sujets atteints de RCH, en période de poussée uniquement (Larsson *et al.* 2011). Une étude a montré dans un modèle de souris délétées pour la glucosyltransférase C1galt1 (et ayant donc des mucines à résidus O-glycanes plus courts) que la couche de mucus colique devient pénétrable par les bactéries ; ces souris développent spontanément une colite inflammatoire (Johansson *et al.* 2014).

Ceci suggère, qu'au-delà d'une simple altération de quantité, la qualité et les propriétés de la couche de mucus chez les sujets atteints de RCH sont affectées.

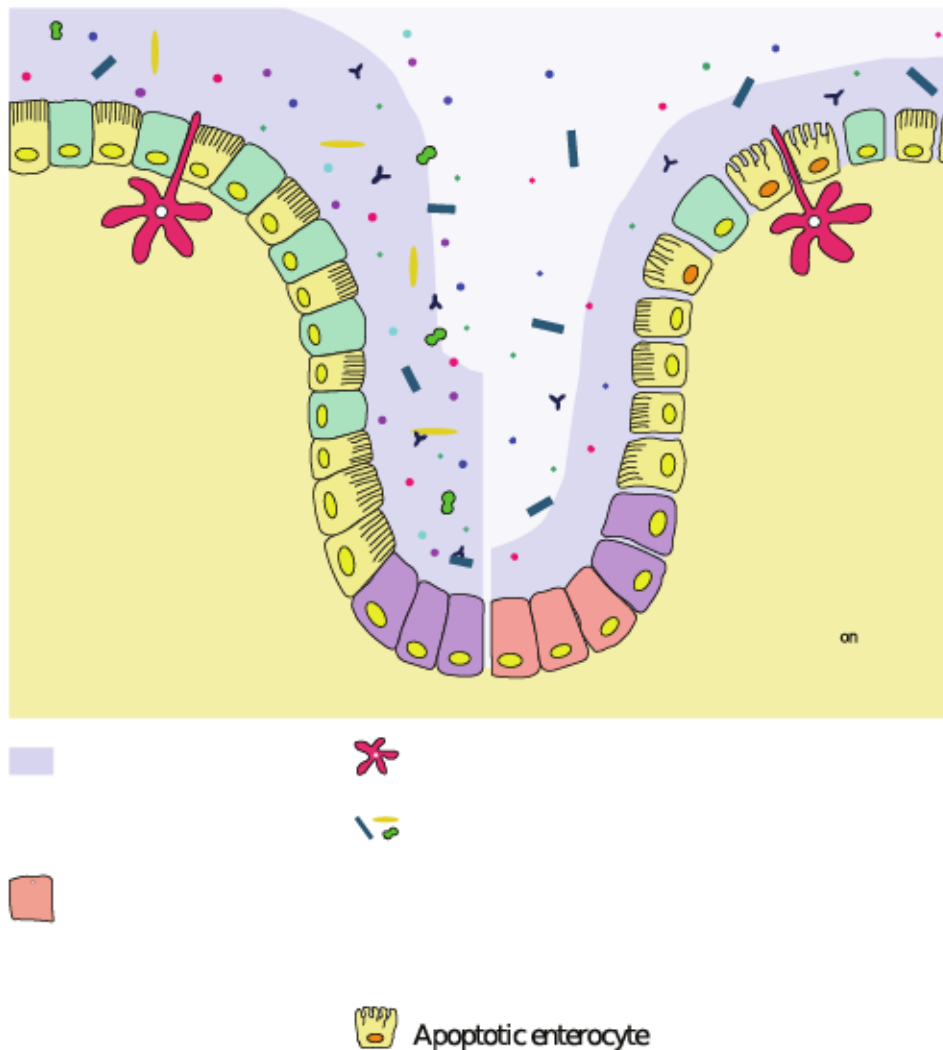


Figure 13 : Illustration des défauts de la barrière chimique et physique du colon dans les MICI (IBD, à droite) par rapport à des sujets sains (Michielan *et al.* 2015). Dans les MICI, l'ensemble des éléments constituant la barrière intestinale est altéré par rapport aux sujets sains. On constate une modification de la sécrétion des peptides antimicrobiens de la famille des Défensines, ainsi qu'une présence métaplasique des cellules de Paneth dans le colon, par rapport à un colon 'normal'. La couche de mucus et le nombre de cellules à mucus sont diminués dans les MICI. Il y a également plus de cellules apoptotiques, fragilisant l'intégrité de l'épithélium et de la barrière. Les jonctions serrées (formées par les Claudines, l'Occludine, JAM et ZO-1) sont également déstabilisées entraînant une perméabilité du tissu plus importante. Les autres types de jonctions intercellulaires du complexe apical jonctionnel (jonctions adhérentes et desmosomes) sont également affectés.

c. *Leaky gut* : Perméabilité et jonctions serrées dans les MICI

L'implication dans les MICI d'un défaut de barrière, ou d'un '*leaky gut*', comme conséquence de l'inflammation, ou bien comme cause de celle-ci, reste encore discutée à ce jour. Cependant, un certain nombre d'études portant sur la perméabilité intestinale des sujets souffrant de MICI sont en faveur d'un rôle causal de l'altération de la barrière (Figure 13).

Une équipe pionnière, ayant mis au point une méthode de mesure non invasive reposant sur le dosage dans les urines de la fraction excrétée d'un traceur inerte non métabolisable ayant traversé la barrière intestinale, a montré une perméabilité augmentée chez les sujets souffrant de MC, et chez leurs apparentés sains (Hollander *et al.* 1986). Bien que ces résultats aient été contredits par une seconde étude (Munkholm *et al.* 1994), d'autres travaux ont également montré, par la mesure de l'excrétion urinaire de Lactitol/Mannitol, une perméabilité intestinale augmentée chez les sujets atteints de MC et leur famille, suggérant un rôle de facteurs environnementaux communs (Fries *et al.* 2005; Peeters *et al.* 1997 ; Pearson *et al.* 1982; Ukabam *et al.* 1983). Cependant, ces études reposaient sur des méthodes de mesure indirecte, et peu précise, de perméabilité intestinale. Plus récemment, des travaux utilisant la technique des **chambres de Ussing**, permettant une mesure *ex vivo* directe d'un passage de traceur ou de TEER dans des segments choisis de l'intestin, ont apporté de nouvelles données sur la perméabilité dans les MICI (résumées en Tableau 3). Une étude a montré l'augmentation de perméabilité, dans des biopsies caecales, chez des sujets sains souffrant de symptômes de type intestin irritable et confirmé celles des sujets atteints de MC ou RCH, tous en période de rémission (Vivinus-Nébot *et al.* 2014), suggérant une **altération intrinsèque de la barrière intestinale avant l'apparition des symptômes**. Ceci a également été corroboré par une étude récente montrant une perméabilité iléale plus importante chez des jumeaux atteints de MC, mais aussi chez les jumeaux non malades, par rapport aux contrôles sains (Keita *et al.* 2018). Une autre équipe a montré une diminution de la résistance épithéliale dans le colon de sujets atteints de MC, mais uniquement en période de poussée (Zeissig *et al.* 2007).

De nombreuses études sur les protéines de jonctions serrées (récapitulées en Tableau 3) corroborent le défaut de leur ultrastructure qui avait été rapporté chez les sujets atteints de MICI par des travaux plus anciens (Gitter *et al.* 2001; Marin *et al.* 1983; Schmitz *et al.* 1999). Ces études reportent chez les sujets malades une diminution de l'Occludine, JAM-A, de la

Tricelluline, de ZO-1 et de plusieurs Claudines dites étanches, ainsi que l'augmentation ou l'induction de l'expression de la Claudine-2 ('*pore-forming*') (Tableau 3 et Figure 14).

Certaines de ces études ont permis de relier défaut de perméabilité et jonctions serrées comme montré en Tableau 3.

L'implication particulière de la Claudine-2, dite 'poreuse', et de l'apoptose dans l'augmentation de perméabilité est confirmée par une étude montrant également que les cellules de la *lamina propria* des sujets produisent plus d'Interleukine-13 (IL13) (Heller *et al.* 2005), cytokine dont l'implication dans le contrôle des jonctions a été bien caractérisée (Figure 10).

De plus, une étude récente (Krug *et al.* 2018) a permis d'apporter de nouveaux éléments : les auteurs montrent une forte diminution la Tricelluline dans le colon de sujets atteints de RCH mais pas de MC (qui présentent toutefois une relocalisation de la Tricelluline au niveau de l'épithélium de surface) et confirment l'induction de l'expression de la Claudine-2, ainsi qu'une perméabilité du tissu aux ions et aux macromolécules augmentée. De plus, ils démontrent habilement, par des expériences complémentaires *in vitro* et *in vivo* que l'IL13 est à l'origine de ces modifications. Toutefois, la régulation positive de la Claudine-2 et celle négative de la Tricelluline font intervenir deux voies distinctes, respectivement *via* le récepteur à l'IL13- α 1 (IL13R α 1) et *via* l'IL13R α 2. L'activation de la première voie augmente la perméabilité aux ions du *pore pathway* tandis que celle de la deuxième voie a pour conséquence une augmentation du passage de macromolécules dans le *leak pathway*.

La mise en évidence d'une augmentation de l'expression et de l'activité de la MLCK (et de la phosphorylation de la chaîne légère de la Myosine) dans l'épithélium et le colon de sujets malades, corrélant avec l'activité de la maladie, a permis de préciser les mécanismes de la dérégulation des jonctions dans les MICI (Blair *et al.* 2006). L'implication de la kinase ROCK a également été suggérée par une étude montrant une augmentation de la forme active de la petite GTPase RhoA (dont ROCK est un effecteur) dans les zones inflammées de biopsies de sujets atteints de RCH et MC, en corrélation avec le niveau de TNF- α (Segain *et al.* 2003).

L'implication des jonctions intercellulaires dans le défaut de barrière des MICI ne se limite pas aux jonctions serrées et concerne de façon plus large tout le complexe apical jonctionnel (montrée en Figure 13 et résumée en Tableau 3).

En effet, l'expression et la localisation jonctionnelle des protéines des jonctions adhérentes E-Cadhérine et ses partenaires α - et p120-Caténines ont été montrées comme perturbées chez les

sujets atteints de MICI, dans les zones lésées (Karayiannakis *et al.* 1998; Vivinus-Nébot *et al.* 2014). Ces observations ont précédé l'implication de la E-Cadhérine dont le loci de son gène *CDH1* est associé aux MICI (Consortium *et al.* 2009) et dont un SNP associé à la MC conduit à une protéine délocalisée (Muise *et al.* 2009). La diminution de l'expression de la E-Cadhérine mais aussi de la p120-Caténine chez les sujets atteints de RCH a été confirmée plus récemment (Zhang *et al.* 2015). De plus, comme mentionné précédemment, le variant *I33F** du gène *C1orf106* a été identifié par les GWAS comme un locus à risque pour les MICI. Il conduit à une forme instable de la protéine codée, dont la forme sauvage limite l'internalisation de protéines transmembranaires dont la E-Cadhérine ; sa perte ou son instabilité conduit à la déstabilisation des jonctions adhérentes et une dysfonction de la barrière intestinale *in vitro* et *in vivo* (Mohan *et al.* 2018).

Enfin, notre équipe a montré pour la première fois, dans le colon de sujets atteints de RCH et MC, la délocalisation de la protéine cellulaire du prion (PrP^C), composante des desmosomes qui est requise pour le maintien de la fonction de barrière (Petit *et al.* 2012). L'altération des desmosomes chez les sujets atteints de MC a depuis été confirmée par deux études montrant la délocalisation des cadhérines desmosomales Desmocolline-2 et Desmoglérine-2 (Spindler *et al.* 2015 ; Gross *et al.* 2018).

On peut noter que Zeissig *et al.* ont également montré une **apoptose** des cellules épithéliales augmentée chez les sujets atteints de MC en période active (Zeissig *et al.* 2007). Cet effet participe à l'augmentation de perméabilité observée et peut être atténué par un traitement anti-TNF α , confirmant le rôle cette cytokine dans le défaut de barrière des MICI (Zeissig *et al.* 2004).

La déstructuration des jonctions intercellulaires et l'augmentation de perméabilité intestinale (résumées en Tableau 3) dans les MICI sont désormais sans équivoque. Cependant, les études chez l'Homme n'ont pas permis de véritablement conclure sur un défaut de barrière comme élément causal dans ces pathologies. Ceci a donc conduit à l'étude de la dysfonction de la barrière intestinale dans des modèles animaux, permettant de mieux isoler et décrypter la contribution des différents compartiments de l'intestin dans la physiopathologie des MICI (Figure 14).

		MC	RCH	Étude de la perméabilité intestinale chez l'Homme	Référence
JONCTIONS SERREES	Occludine	Diminuée (ARNm)	Diminuée (ARNm)	Augmentée (macromolécules, période quiescente, symptômes IBS)	(Vivinus-Nébot <i>et al.</i> 2014)
		Diminuée (WB)	ND	Augmentée (ions et macromolécules, période active, apoptose)	(Zeissig <i>et al.</i> 2007)
		Diminuée (WB et IF)	ND	ND	(Spindler <i>et al.</i> 2015)
		ND	Diminuée (WB)	ND	(Heller <i>et al.</i> 2005)
	Tricelluline	Diminuée (IF)	ND	Augmentée (ions et macromolécules, jumeaux sains et malades)	(Keita <i>et al.</i> 2018)
		Relocalisation (IF)	Diminuée (WB et IF)	Augmentée (ions et macromolécules)	(Krug <i>et al.</i> 2018)
	JAM-A	Diminuée (WB)	Diminuée (WB)	ND	(Vetrano <i>et al.</i> 2008)
	ZO-1	Diminuée (ARNm)	Diminuée (ARNm)	Augmentée (macromolécules, période quiescente, symptômes IBS)	(Vivinus-Nébot <i>et al.</i> 2014)
	Claudine-4	Non modifiée	Diminuée (WB)	Augmentée (ions et macromolécules)	(Krug <i>et al.</i> 2018)
		Diminuée (IHC et WB)	Diminuée (IHC et WB)	ND	(Prasad <i>et al.</i> 2005)
		Diminuée (WB et IF)	ND	Augmentée (ions et macromolécules, période active, apoptose)	(Zeissig <i>et al.</i> 2007)
	Claudine-5	Diminuée (WB et IF)	ND		
	Claudine-8	Diminuée (WB et IF)	ND		
	Claudine-2 'poreuse'	Augmentée (WB et IF)	ND	Augmentée (ions et macromolécules, période active, apoptose)	(Zeissig <i>et al.</i> 2007)
Non modifiée		Augmentée (WB et IF)	Augmentée (ions et macromolécules)	(Krug <i>et al.</i> 2018)	
JONCTIONS ADHERENTES	E-Cadhérine	Diminuée (IHC)	Diminuée (IHC)	ND	(Karayiannakis <i>et al.</i> 1998)
		ND	Diminuée (IHC)	ND	(Zhang <i>et al.</i> 2015)
	p120-Caténine	Diminuée (IHC)	Diminuée (IHC)	ND	(Karayiannakis <i>et al.</i> 1998)
		ND	Diminuée (IHC)	ND	(Zhang <i>et al.</i> 2015)
	α -Caténine	Diminuée (IHC)	Diminuée (IHC)	ND	(Karayiannakis <i>et al.</i> 1998)
		Diminuée (ARNm)	Diminuée (ARNm)	Augmentée (macromolécules, période quiescente, symptômes IBS)	(Vivinus-Nébot <i>et al.</i> 2014)
β -Caténine	ND	Diminuée (IHC)	ND	(Zhang <i>et al.</i> 2015)	
DESMOSOMES	PrPc	Délocalisation (IF)	Délocalisation (IF)	ND chez l'Homme (mais augmentée dans la souris invalidée)	(Petit <i>et al.</i> 2012)
	Desmogléine-2	Diminuée (WB)	ND	ND	(Spindler <i>et al.</i> 2015)
		Diminuée (WB et IF)	ND	ND chez l'Homme (mais augmentée dans la souris invalidée)	(Gross <i>et al.</i> 2018)
Desmocolline-2	Diminuée (WB et IF)	ND	ND chez l'Homme (mais augmentée dans la souris invalidée)	(Gross <i>et al.</i> 2018)	

Tableau 3 : Vue d'ensemble des modifications des protéines de jonctions intercellulaires, parfois associées à une augmentation de la perméabilité intestinale, reportées chez l'Homme, chez les sujets atteints de Maladie de Crohn (MC) ou de Rectocolite Hémorragique (RCH). ND : Non Documenté ; IF : ImmunoFluorescence ; IHC : ImmunoHistoChimie ; WB : Western-Blot.

d. Modèles murins de défaut de barrière

Pour étudier *in vivo* les mécanismes sous-tendant les MICI, les modèles les plus couramment employés sont des modèles de **colite inflammatoire induite chimiquement** chez le rongeur en utilisant soit le DSS (déclenchant des symptômes de type RCH) (Okayasu *et al.* 1990), soit l'acide Sulfonique TriNitroBenzene, TNBS (déclenchant des symptômes de type MC) (Morris *et al.* 1989). Il existe d'autres modèles récapitulant un phénotype type MICI (Jiminez *et al.* 2015), comme les souris invalidées pour l'expression de l'IL10 (développant spontanément une colite) ou bien le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺CD45RB^{hi}, qui a notamment permis de montrer *in vivo* que l'activation de la MLCK et la déstabilisation des jonctions serrées par le TNF- α requiert l'induction de l'expression de son récepteur par l'IFN- γ (Wang *et al.* 2006). Toutefois, ces modèles ne permettent pas de répondre à la question d'un rôle **initiateur de l'altération de la barrière intestinale**, avant l'installation de la pathologie (Figure 14).

Ceci a conduit à l'établissement de modèles de rongeurs mutés pour diverses protéines de jonctions serrées, afin de mieux discriminer leur participation dans la barrière (Xing *et al.* 2017). De façon surprenante, la plupart de ces modèles ne présente aucun véritable défaut de barrière, comme nous l'avons déjà évoqué avec le cas des souris invalidées pour l'expression de l'Occludine (partie I.B.iv.b.)(Saitou *et al.* 2000). Une exception est celle du modèle murin invalidé pour le gène de *Jam-a* (souris JAM-A^{-/-}) ; ces souris présentent une perméabilité intestinale augmentée et une susceptibilité accrue à la colite expérimentale induite par DSS par rapport aux contrôles (Laukoetter *et al.* 2007). Toutefois, JAM-A est exprimée dans d'autres types cellulaires que les cellules épithéliales (notamment endothéliales) (Martin-Padura *et al.* 1998), et son invalidation spécifiquement dans l'épithélium intestinal n'a pas été étudiée. L'invalidation ciblée dans les cellules endothéliales (Vetrano *et al.* 2008) n'entraîne pas de susceptibilité accrue à la colite inflammatoire.

On peut également mentionner le phénotype des souris invalidées spécifiquement dans l'épithélium intestinal pour le facteur de transcription HNF4 α (Cattin *et al.* 2009), qui participe à la formation et maturation des jonctions intercellulaires (Battle *et al.* 2006; Chiba *et al.* 2003) et dont le gène se situe dans un locus à risque dans les MICI (Consortium *et al.* 2009). Comme montré par notre équipe, au niveau de l'épithélium intestinal de ces souris transgéniques, les jonctions adhérentes et serrées sont déstabilisées ce qui s'accompagne d'une augmentation modérée (d'un facteur 1.75) de la perméabilité intestinale (Cattin *et al.* 2009). Cependant, l'état inflammatoire de ces souris n'a pas été étudié.

L'expression ciblée dans l'épithélium intestinal d'une forme constitutivement active de la MLCK (CA-MLCK) a permis de montrer que celle-ci induit une augmentation de perméabilité modérée chez les souris, sans modification majeure de la localisation des protéines de jonctions intercellulaires (Su *et al.* 2009). Bien que cet effet soit accompagné d'une activation inflammatoire sous-clinique de la muqueuse intestinale (et non pas d'une inflammation systémique), les souris ne développent pas spontanément de pathologie. Elles sont en revanche plus prônes et sensibles à développer une colite inflammatoire (induite par transfert adoptif de cellules immunitaires).

Une autre étude de notre équipe a montré, dans le modèle murin invalidé pour la PrP^c, une diminution, aux contacts cellules-cellules, des protéines des trois types de jonctions intercellulaires ainsi qu'une perméabilité intestinale augmentée (d'un facteur 2). De nouveau, ces effets coïncident avec une activation sous-clinique inflammatoire de la muqueuse intestinale, sans que ces animaux ne développent de pathologie apparente. Les souris invalidées pour la PrP^c sont néanmoins sensibilisées à la colite inflammatoire induite par DSS (Petit *et al.* 2012).

Ces différents modèles ont permis de mieux distinguer, de façon séquentielle, le rôle de l'altération de la barrière de celui de l'inflammation. Ils ont notamment pu montrer qu'un **défaut modéré de perméabilité intestinale**, bien qu'il s'accompagne d'une inflammation tissulaire de bas-grade, n'est pas suffisant au déclenchement spontané d'une pathologie intestinale dans un environnement contrôlé, mais qu'en revanche, il **prédispose et sensibilise** à la survenue d'une colite lors de l'exposition à un événement déclencheur (Figure 14). Ceci a apporté de nouveaux éléments sur la physiopathologie des MICI.

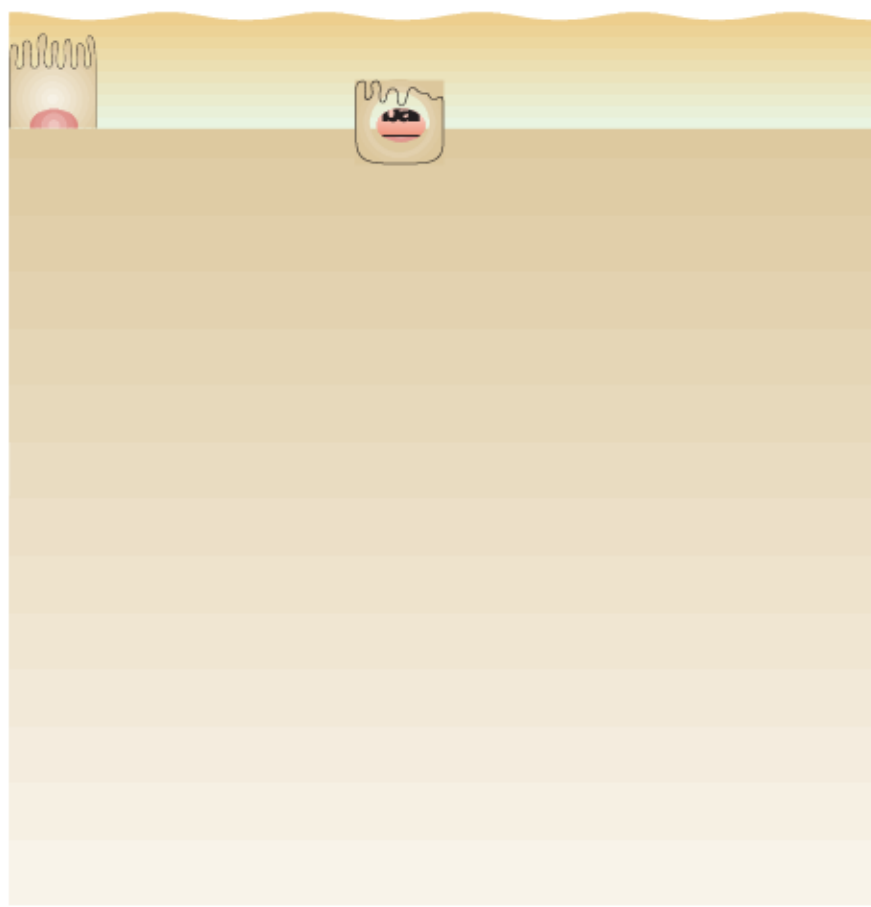


Figure 14 : Physiopathologie séquentielle des MICI (Neurath 2014). Des facteurs génétiques et environnementaux participent à la fragilisation de la barrière intestinale. Le passage de fragments ou produits bactériens contribue à l'activation du système immunitaire de la muqueuse. En phase initiale, celle-ci reste de bas-grade. Un événement initiateur amplifie ce mécanisme, l'inflammation est alors sévère et contribue en retour à la détérioration de la barrière. Ceci met en place un cercle vicieux de barrière altérée et d'inflammation. Si cette rupture d'équilibre n'est plus atténuée par les réponses immuno-régulatrices (notamment des lymphocytes T régulateurs, *T_{Reg} cells*), la maladie devient alors chronique. La chronicité de la maladie peut conduire à des complications telles que la fibrose, des sténoses, abcès, fistules devant être opérés, mais aussi des manifestations extra-digestives. Les sujets souffrants de MC ou RCH ont également un risque accru de développement d'un cancer digestif.

iv. Dysbiose du microbiote intestinal humain dans les MICIa. **La composition du microbiote intestinal humain**

Le microbiote intestinal humain est constitué à plus de 90% par quatre grands phyla bactériens, majoritairement les **Firmicutes** (49–76 %) et **Bacteroidetes** (16–23 %), suivis des **Proteobactéries** et **Actinobactéries**, auxquels on peut ajouter les **Verrucomicrobia** (principalement représenté par les bactéries du genre *Akkermansia*) (Eckburg *et al.* 2005; Qin *et al.* 2010; Human Microbiome Project 2012; Tap *et al.* 2009; Matsuoka *et al.* 2015). Le microbiote intestinal comprend également des **archées**, des organismes eucaryotes (notamment les **champignons**) et des **virus** d'eucaryotes et procaryotes, dont les bactériophages (Rajilic-Stojanovic *et al.* 2014).

Concernant le **microbiote bactérien**, qui reste le plus étudié, les Firmicutes sont majoritairement représentés par les classes de Clostridia (incluant les familles de *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*) ainsi que la classe des *Bacilli* (comprenant les genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, et *Streptococcus*). Les Firmicutes sont, de manière générale, indiqués comme des bactéries Gram-positives, et comprend des espèces telles que *Faecalibacterium prausnitzii* (de la famille des *Ruminococcaceae*). La majorité des bactéries intestinales du phylum des Bacteroidetes, Gram-négatives, appartient aux familles de *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* ou *Porphyromonadaceae*. Parmi le phylum des Actinobactéries, on retrouve essentiellement dans le tractus gastro-intestinal des membres de la famille *Bifidobacteriales* et *Coriobacteriales* (Figure 15A).

Le microbiote fongique intestinal humain, ou **mycobiote**, (Figure 15A) représente environ 0.1% du microbiote (Qin *et al.* 2010), bien que ce chiffre soit probablement sous-estimé. Plus de 50 genres y sont représentés et les genres *Candida*, *Saccharomyces* et *Cladosporium* sont les plus abondants (Underhill *et al.* 2014).

L'étude du **virome** humain, en plein essor, est bien plus récente que celle du microbiote bactérien et l'identification et la classification de la population de virus eucaryotes mais surtout procaryotes, les phages, sont loin d'être aussi avancées que celles des bactéries (Sausset *et al.* 2020; Ungaro *et al.* 2019). Les estimations actuelles évaluent les virus aussi nombreux ou 10 à 100 fois moins que les bactéries, bien que ces chiffres restent très discutés (Shkoporov *et al.* 2019). Une étude récente a montré que l'intestin sain humain héberge un **phagéome** qui peut être réparti en 3 classes : un noyau commun à 50% de la population étudiée, un second noyau

retrouvé dans 20 à 50% de la population, et enfin un répertoire de phages très peu partagé (2-20%) ou presque unique à chaque individu (Manrique *et al.* 2016).

Bien que la composition du microbiome varie entre individus, les **fonctions métaboliques** sont incroyablement stables et conservées (Human Microbiome Project 2012).

Comme évoqué dans la première partie de cette introduction (p. 7), la diversité et composition du microbiote intestinale varie le long du tractus digestif, en fonction des spécificités physiologiques des différents segments (Figure 15B). Bien que l'analyse du microbiote intestinal repose dans la majorité des études sur le contenu bactérien des selles et soit donc un reflet de la flore du colon, d'autres études (notamment à partir de biopsies digestives) ont permis d'affiner la composition du microbiote du tractus digestif. Brièvement, les Proteobacteria et Firmicutes, dont les *Lactobacillales* sont enrichis au niveau de l'intestin grêle, où l'on retrouve de plus grandes concentrations d'oxygène, d'AMPs mais surtout de monosaccharides et disaccharides (Donaldson *et al.* 2016). En revanche, dans le colon, où l'on retrouve la plus grande abondance et diversité du tractus, les Bacteroidetes et Firmicutes (dont les *Clostridiales*) sont prédominants et fermentent les polysaccharides non digérés par l'hôte en Acides Gras à Chaîne Courte (AGCC) (Koh *et al.* 2016 ; Rajilic-Stojanovic *et al.* 2014) (Figure 15B).

De plus, la composition du microbiote varie localement au sein d'un même segment entre le compartiment proche de la muqueuse (où prédominent, dans le colon, des Firmicutes des familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*) et le digesta ou les selles (où prédominent, dans le colon, des Bacteroidetes des familles *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* et *Rikenellaceae*) (Eckburg *et al.* 2005; Lavelle *et al.* 2015).

Ainsi, le microbiote intestinal humain est un écosystème particulièrement complexe et différent des autres microbiotes humains (Human Microbiome Project 2012), qui s'est adapté aux contraintes locales de l'environnement par des mécanismes de co-évolution des micro-organismes avec l'hôte. La complexité de cet écosystème et celle des fonctions du microbiote, décrites en première partie, font des **interactions hôte-microbiote un équilibre fragile**, qui peut être rompu dans de nombreuses pathologies.

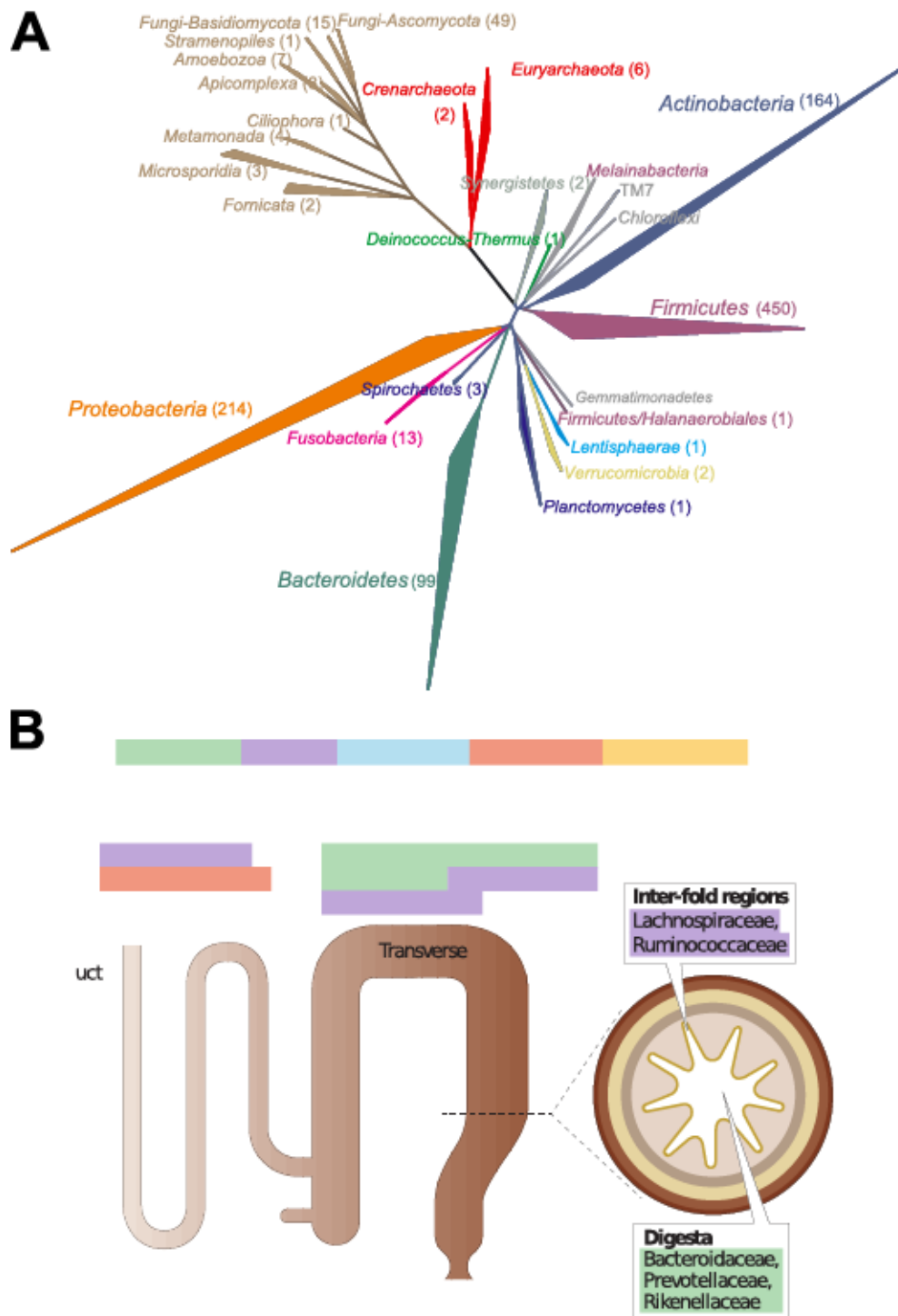


Figure 15 : Le microbiote intestinal humain. (A) Arbre phylogénétique du microbiote humain comprenant les bactéries, les archées et les champignons. Les bactéries commensales appartiennent principalement aux quatre phyla des Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria et Actinobacteria. Le microbiote fongique humain est majoritairement constitué par les Basidiomycètes et les Ascomycètes. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'espèces cultivables dans les catégories concernées (Rajilic-Stojanovic *et al.* 2014) **(B) Distribution du microbiote bactérien dans le tube digestif.** Dans l'intestin grêle, riche en oxygène, peptides antimicrobiens et acides biliaires, on retrouve majoritairement les Proteobacteria et Firmicutes, dont les *Lactobacillales*, tandis que dans le colon, où l'abondance est la plus importante et l'oxygène le plus rare, les Bacteroidetes (des familles *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* et *Rikenellaceae*) et Firmicutes (des familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*), capables de dégrader les polysaccharides non digérés par l'hôte, dominant. De plus, on observe des variations locales de la distribution bactérienne avec des niches écologiques spécifiques : dans le colon, les Firmicutes cités sont associés à des régions proches de la muqueuse tandis que les Bacteroidetes mentionnés sont plutôt retrouvés dans le digesta au niveau de la lumière (Donaldson *et al.* 2016).

b. Caractéristiques de la dysbiose dans les MICI

Bien que l'étiologie des MICI reste encore discutée, l'**implication du microbiote intestinal** est sans équivoque (Nishida *et al.* 2018). Parmi les quelques 200 loci associés aux MICI identifiés, de nombreux gènes sont impliqués dans la réponse immunitaire de l'hôte (innée ou adaptative) et la tolérance au microbiote intestinal, pointant ainsi le rôle de cet écosystème et des interactions complexes avec l'hôte dans la physiopathologie des MICI (Jostins *et al.* 2012; Liu *et al.* 2015a). Plusieurs études ont montré que différents modèles murins transgéniques qui développent spontanément des colites expérimentales sont protégés de la pathologie lorsque les animaux sont élevés en conditions axéniques (Contractor *et al.* 1998; Matsumoto *et al.* 1998; Sellon *et al.* 1998). Trois théories (non exclusives) sont proposées pour expliquer les liens entre le microbiote et la pathologie: (i) un défaut de 'confinement' du microbiote commensal (autrement dit, une dysfonction de la barrière) et/ou de réponse immunitaire de l'hôte (causés par des facteurs génétiques et environnementaux), (ii) la persistance de pathogènes intestinaux induisant une inflammation, (iii) des modifications de la composition du microbiote commensal conduisant à un déséquilibre entre effets bénéfiques et délétères (Sartor 2008).

Les modifications de la richesse et de la composition du microbiote intestinal (dysbiose) sont une des caractéristiques de la physiopathologie des MICI (Kostic *et al.* 2014). De nombreuses études ont permis de caractériser la **dysbiose dans les MICI** (Knox *et al.* 2019) qui est résumée en Tableau 4. Brièvement, la dysbiose bactérienne des MICI est caractérisée par une réduction de la diversité bactérienne, une diminution du genre *Bacteroides*, une réduction de la diversité des Firmicutes et une augmentation des Proteobacteria.

De façon générale, l'**équilibre** entre les micro-organismes connus pour avoir un rôle bénéfique et ceux potentiellement agressifs est **rompu dans la dysbiose** (Figure 16). Ceci s'illustre par les variations au sein du phylum des Firmicutes : l'abondance de bactéries de la classe des *Clostridia* comme *Faecalibacterium prausnitzii* (Forbes *et al.* 2018 ; Sokol *et al.* 2009) dont les **effets anti-inflammatoires** ont été montrés par notre équipe (Laval *et al.* 2015a; Quevrain *et al.* 2016a; Quevrain *et al.* 2016b; Sokol *et al.* 2008) est diminuée tandis que celle des espèces **mucohydriques** *Ruminococcus gnavus* et *torques* est augmentée (Png *et al.* 2010) (Tableau 4). De même, l'expansion des *Proteobacteria* est caractérisée par l'augmentation des *Escherichia coli* aux **propriétés invasives et adhérentes** (AIEC, pour *Adherent-Invasive E. coli*), associées à ou ayant envahi la muqueuse iléale (Baumgart *et al.* 2007; Darfeuille-Michaud *et al.* 2004) ou colique (Sasaki *et al.* 2007), particulièrement chez les sujets atteints de MC (Figure 16).

Modifications du microbiote bactérien		Référence
Instabilité temporelle		(Martinez <i>et al.</i> 2008)
Réduction de l' α -diversité		(Gevers <i>et al.</i> 2014 ; Forbes <i>et al.</i> 2018 ; Frank <i>et al.</i> 2007)
Diminution des <i>Bacteroides</i>		(Gevers <i>et al.</i> 2014)
Réduction de la diversité des Firmicutes	Diminution des Clostridia dont <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (propriétés anti-inflammatoires) Augmentation de <i>Ruminococcus gnavus</i> (muco-lytique) Augmentation de <i>Ruminococcus torques</i> (muco-lytique)	(Forbes <i>et al.</i> 2018 ; Sokol <i>et al.</i> 2009) (Png <i>et al.</i> 2010)
Augmentation des <i>Proteobacteria</i>	<i>Escherichia coli</i> adhérente-invasive (entéropathogène) <i>Camphylobacter</i> (entéropathogène) <i>Fusobacterium</i>	(Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> 2004 ; Sokol <i>et al.</i> 2006) (Man <i>et al.</i> 2009 ; Zhang <i>et al.</i> 2009)
Diminution d' <i>Akkermansia muciniphila</i> (muco-lytique)		(Png <i>et al.</i> 2010)
Modifications du mycobiome		
Augmentation du ratio champignons/bactéries		(Sokol <i>et al.</i> 2016)
Augmentation du ratio Basidiomycètes/Ascomycètes	Diminution de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Diminution de <i>Malassezia sympodialis</i> Augmentation de <i>Candida albicans</i> Augmentation de <i>Candida tropicalis</i>	(Sokol <i>et al.</i> 2016) (Hoarau <i>et al.</i> 2016)
Modifications du virome		
Augmentation de la richesse en phages (corrélée à la réduction de la richesse bactérienne)		(Norman <i>et al.</i> 2015)
Augmentation des bactériophages <i>Caudovirales</i>		(Norman <i>et al.</i> 2015)
Augmentation des bactériophages ciblant <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		(Cornuault <i>et al.</i> 2018)
Modifications métaboliques caractéristiques du microbiote		
Diminution du métabolisme et biosynthèse des acides aminés		(Morgan <i>et al.</i> 2012 ; Jansson <i>et al.</i> 2009)
Diminution du métabolisme des AGCC		(Morgan <i>et al.</i> 2012)
Diminution du métabolisme du Tryptophane		(Lamas <i>et al.</i> 2016 ; Nikolaus <i>et al.</i> 2014)
Diminution des acides biliaires secondaires Augmentation des acides biliaires conjugués et sulphatés		(Duboc <i>et al.</i> 2013)
Augmentation de la biosynthèse et du transport de métabolites favorisant le stress oxydant		(Morgan <i>et al.</i> 2012 ; Jansson <i>et al.</i> 2009)
Augmentation des voies impliquées dans la pathogénicité bactérienne		(Morgan <i>et al.</i> 2012)

Tableau 4 : Caractéristiques de la dysbiose bactérienne, fongique et virale dans les MICI.

Les micro-organismes (ou modifications) augmentés sont inscrits en rouge, tandis que ceux notés en bleu sont diminués. Certaines propriétés connues des micro-organismes sont indiquées entre parenthèses.

Des résultats contradictoires ont été rapportés concernant le genre *Yersinia* (Knösel *et al.* 2009; Lamps *et al.* 2003) ainsi que pour la bactérie pathogène alimentaire *Listeria monocytogenes* (Liu *et al.* 1995; Walmsley *et al.* 1998). Une étude sur le long-terme a montré que les gastroentérites causées par une infection par *Salmonella* ou *Campylobacter* augmente le risque de survenue de MICI dans la population danoise (Gradel *et al.* 2009). Cependant, hormis pour les AIEC, la mise en évidence de l'implication des entéropathogènes dans les MICI et leur rôle causal restent discutés à ce jour (Chassaing *et al.* 2011; De Hertogh *et al.* 2008).

Outre la dysbiose bactérienne, le microbiote **fongique** est également modifié dans les MICI avec principalement une réduction de la diversité fongique, une diminution de l'abondance de *Saccharomyces cerevisiae* chez les sujets atteints de RCH et MC et une augmentation des *Candida albicans* et *C. tropicalis* chez les sujets atteints de MC (Tableau 4 et Figure 16). De même, le répertoire viral, et plus particulièrement celui des bactériophages, est augmenté dans les MICI (Cornuault *et al.* 2018; Norman *et al.* 2015).

De façon intéressante, différents groupes ont montré des corrélations entre les modifications du microbiote bactérien et celles du mycobiome (Hoarau *et al.* 2016; Sokol *et al.* 2016) ou avec celles du phagôme (Norman *et al.* 2015), ce qui suggère l'existence d'**altérations inter-règnes** spécifiques à la MC et la RCH (Figure 16A).

Au-delà de modifications de la composition d'espèces, la **composition fonctionnelle** du microbiome est altérée dans les MICI (Kostic *et al.* 2014; Lavelle *et al.* 2020), comme reporté en Tableau 4.

Une étude de 2012 a montré que seulement 2% des genres bactériens sont modifiés dans les MICI, alors que 12% des voies métaboliques le sont (d'après le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN16S ribosomal bactérien et l'analyse des voies à l'aide de KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Morgan *et al.* 2012). De plus, les auteurs ont montré que le métabolisme de base (par exemple la biosynthèse d'acides aminés) et la production d'AGCC sont réduits chez les sujets atteints de RCH ou MC, tandis que la biosynthèse et le transport de métabolites favorisant le stress oxydatif (systèmes de transport de sulfate et glutathion) et conférant des propriétés adhérentes ou pathogéniques (sécrétion de toxines, systèmes effecteurs) sont augmentés, particulièrement dans le cas de MC iléales (Figure 16).

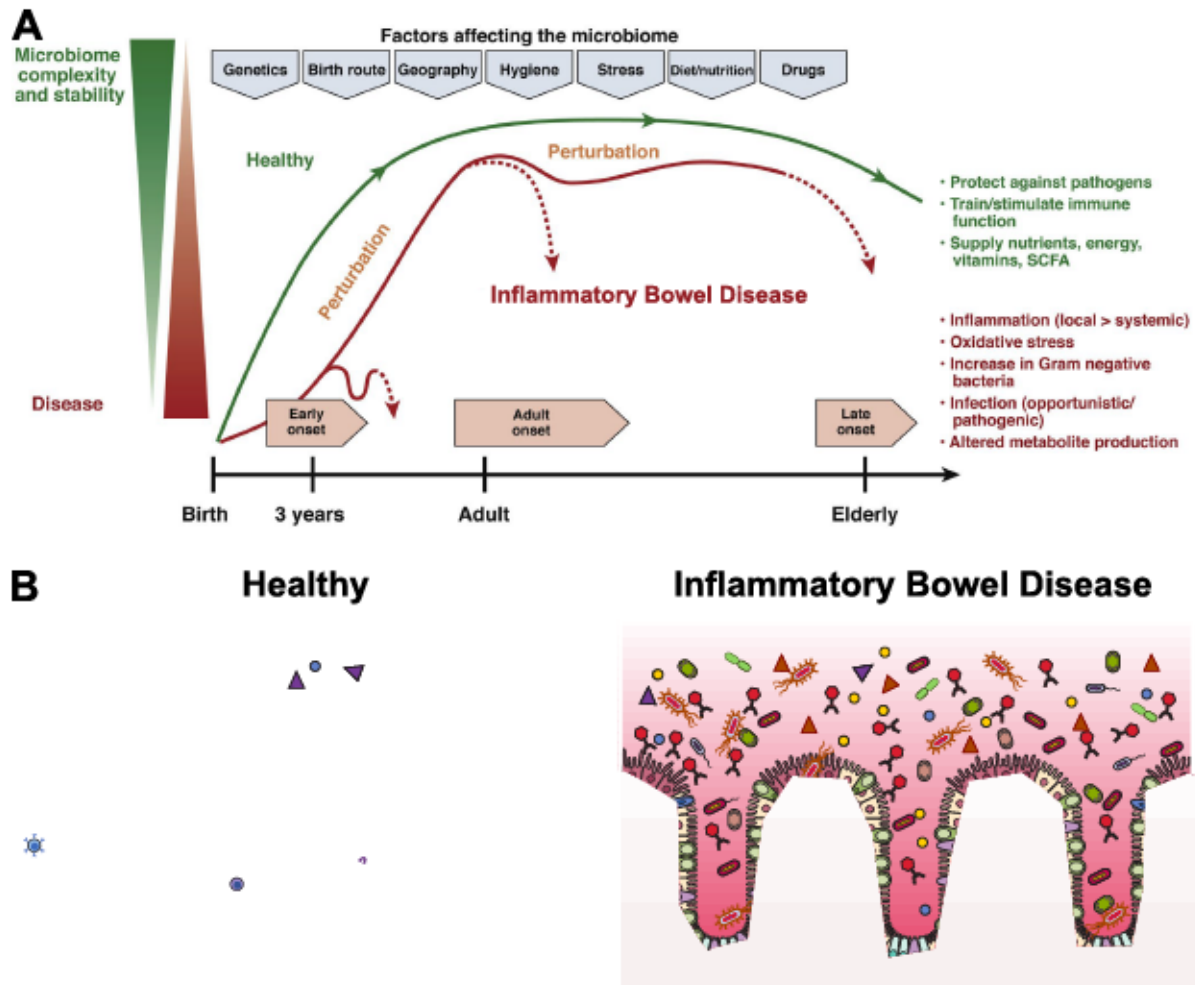


Figure 16 : La dysbiose dans les MICI. (A) Facteurs affectant la composition du microbiote intestinal et la survenue des MICI. La stabilité, la résilience et la diversité du microbiote peuvent être modifiées par des facteurs environnementaux ou génétiques tout au long de la vie. Chez un sujet sain, ces perturbations n'affectent pas les propriétés du microbiote qui assurent ses fonctions d'éducation du système immunitaire et métaboliques (comme la synthèse de vitamines et d'AGCC). En revanche, des facteurs génétiques ou environnementaux peuvent conduire à la rupture d'équilibre entre hôte et microbiote, dont la composition peut être modifiée (augmentation de bactéries Gram-négative ou potentiellement pathogènes) ainsi que ses propriétés fonctionnelles (stress oxydant, fonctions métaboliques). La perturbation de cette homéostasie peut déclencher la survenue de la maladie dès le jeune âge (*early onset*), au début de la vie adulte (*adult onset*) ou plus tardivement (*late onset*) (adapté de Kostic *et al.* 2014). **(B) Caractéristiques de la dysbiose dans les MICI.** Le microbiote sain (à gauche) est caractérisé par une diversité de bactéries et champignons et un équilibre du ratio phages/bactéries. Il assure des fonctions métaboliques telles que la production des métabolites AGCC (SCFAs) et du tryptophane. Par rapport aux sujets sains, la diversité bactérienne et fongique est réduite dans les MICI (à droite). Les *Bacteroides* et Firmicutes (dont *Faecalibacterium prausnitzii*, *F.prau*) sont diminuées tandis que les bactéries mucolytiques ou les bactéries agressives (telles que les Proteobacteria *Escherichia coli* adhérentes-invasives, AIEC) sont augmentées. Le ratio Basidiomycètes/Ascomycètes est augmenté. Les fonctions métaboliques du microbiote sont perturbées : les métabolites bénéfiques (AGCC et tryptophane) sont réduits tandis que les métabolites promouvant le stress oxydant et les acides biliaires sulphatés sont augmentés. Ceci s'accompagne d'une inflammation de la muqueuse et d'une altération de l'intégrité épithéliale (modifié à partir de Ungaro *et al.* 2019).

Ces résultats corroborent ceux d'une autre étude réalisée par spectrométrie de masse montrant des caractéristiques métaboliques différentes entre sujets sains et atteints de MC (et aussi au sein des groupes de MC, iléale ou colique), permettant de les discriminer en fonction de certains métabolites tels que ceux des voies métaboliques des acides aminés, des acides gras, des acides biliaires ou de l'acide arachidonique (Jansson *et al.* 2009).

Ces études génomiques et métabolomiques à large échelle confirment les observations faites dans des cohortes des sujets atteints de MICI, de la réduction d'AGCC (Marchesi *et al.* 2007; Morgan *et al.* 2012; Vernia *et al.* 1988), des niveaux diminués de tryptophane et l'activité moindre du microbiote dans le métabolisme du tryptophane (Lamas *et al.* 2016; Nikolaus *et al.* 2014), ainsi que les modifications des acides biliaires biotransformés (Duboc *et al.* 2013).

Des différences de **profils métaboliques** ayant été reportées dans diverses études, il a été proposé que la métabolomique soit utilisée comme outil de diagnostic des MICI (Storr *et al.* 2013).

Ainsi, les modifications d'une part de la composition du microbiote, et d'autre part de ses fonctions métaboliques, illustrent l'importance des **petites molécules**, produites ou transformées par le microbiote, comme les AGCC ou les métabolites du tryptophane, dans l'homéostasie intestinale et ses dérèglements au cours des MICI (Lavelle *et al.* 2020). Le chapitre suivant aborde un processus encore très peu décrit de dialogue hôte-microbiote, faisant intervenir les molécules du *quorum sensing* bactérien.

III. QUORUM SENSING & INTESTIN

A. PRESENTATION GENERALE DU QUORUM SENSING

i. Principes et mécanismes du quorum sensing

Les micro-organismes unicellulaires ne sont pas des entités isolées mais vivent en **communautés**. Ceci est rendu possible par des moyens de communication leur permettant d'adopter des **comportements de groupe**, en se synchronisant à l'échelle multicellulaire, et de pouvoir ainsi atteindre des bénéfices qui seraient inatteignables à l'échelle unicellulaire (Parsek *et al.* 2005).

Les bactéries communiquent *via* des molécules chimiques de signalisation, appelées **molécules auto-inductrices**, leur donnant une indication de leur environnement (Figure 17). Ce système est nommé le *quorum sensing* (QS) car il repose sur la synthèse par les bactéries et la diffusion, dans l'environnement local, de molécules auto-inductrices, dont la concentration augmente avec la densité bactérienne et qui sont détectées par les bactéries (*sensing*). Lorsque la concentration atteint un seuil (le *quorum*), elle déclenche une réponse aboutissant à la régulation de gènes, et ce de façon coordonnée à l'échelle de la communauté. Ce mécanisme permet donc aux bactéries d'adapter leur comportement en fonction de la densité de population (Figure 17).

Le QS a initialement été découvert dans la bactérie Gram-négative marine *Vibrio fischeri*, qui vit en symbiose avec le calamar *Euprymna scolopes*, et produit de la bioluminescence grâce au QS qui régule l'expression de la luciférase (Nealson *et al.* 1970; Engebrecht *et al.* 1984). *Vibrio fischeri*, localisée dans un organe particulier, produit de la **bioluminescence** qui permet au calamar d'être moins visible de ces prédateurs pendant le jour en masquant son ombre par contre-illumination.

Depuis, d'autres systèmes de QS ont été mis en évidence; ils régulent divers processus **bactériens** tels que la sporulation et compétence (Rudner *et al.* 1991), la virulence (Rutherford *et al.* 2012; Novick *et al.* 1995), la production d'antibiotiques (Takano *et al.* 2001) ainsi que la formation de biofilms (Zhu *et al.* 2003; Parsek *et al.* 2005).

Son implication dans de nombreux processus, souvent reliés à la **pathogénicité**, font du *quorum sensing* une cible potentielle comme moyen de contrôle des bactéries, face à l'antibiorésistance (Defoirdt 2018; Rutherford *et al.* 2012), et ce d'autant plus qu'il existe aussi bien chez les bactéries Gram-positives que négatives.

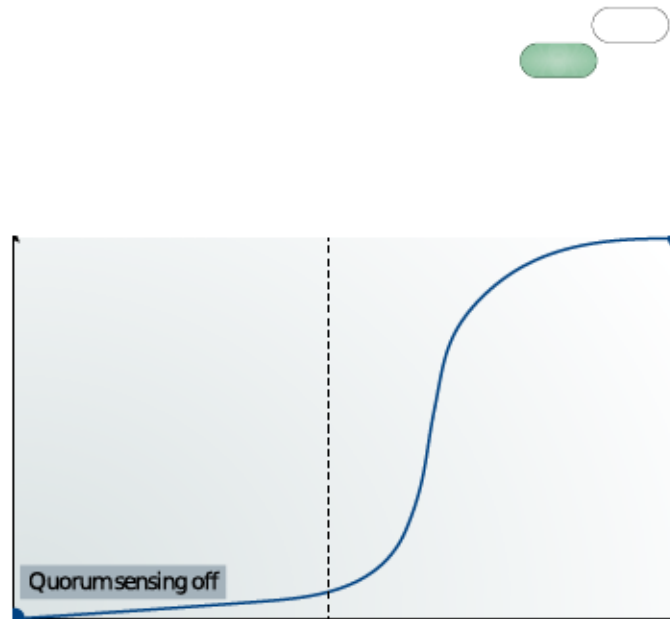


Figure 17 : Principe du *quorum sensing* (Mukherjee *et al.* 2019). Celui-ci repose sur la synthèse par les bactéries et la diffusion, dans l'environnement local, de molécules auto-inductrices (*autoinducers*). Lorsque la densité bactérienne est faible, la concentration de ces molécules l'est aussi (le *quorum sensing* n'est pas activé : *quorum sensing off*). Cette concentration augmente avec la densité bactérienne locale et les molécules auto-inductrices sont détectées par les bactéries. Lorsque la concentration atteint un seuil (*autoinducer threshold*), le *quorum sensing* est activé (*quorum sensing on*) et une réponse aboutissant à la régulation de gènes se déclenche. Ceci opère de façon coordonnée à l'échelle de la communauté et permet donc aux bactéries d'adopter un comportement de groupe (*group behaviours*). Deux conférences TED, données par la biologiste du Howard Hughes Medical Institute spécialisée dans le *quorum sensing*, Bonnie Bassler, ont été consacrées à ce sujet : l'une en 2009, l'autre en 2014 (liens à la suite des références bibliographiques).

ii. Les différents systèmes de *quorum sensing*

Les bactéries Gram-positives ou négatives n'utilisent pas les mêmes systèmes de QS. De nombreuses bactéries possèdent plusieurs types de systèmes de QS, leur permettant ainsi de produire et d'intégrer différents signaux. Nous allons brièvement passer en revue certains de ces systèmes ainsi que ceux d'un *quorum sensing* 'universel', permettant le dialogue entre bactéries Gram-positives et négatives. Ceux-ci sont détaillés en Tableau 5.

a. *Quorum sensing* des bactéries Gram-positives

Les bactéries Gram-positives utilisent le plus communément comme molécules auto-inductrices des **oligopeptides** modifiés de 5 à 17 acides aminés (Ng *et al.* 2009). Ils sont détectés par un récepteur membranaire de la famille des Histidine Kinases et déclenchent l'expression de gènes impliqués dans la virulence ou la compétence (Tableau 5).

De plus, les molécules de la famille des γ -butyrolactones sont utilisées par le genre *Streptomyces* comme signal pour réguler la production d'antibiotiques (Takano *et al.* 2001) ou leur métabolisme (Du *et al.* 2011).

b. *Quorum sensing* des bactéries Gram-négatives

Le *quorum sensing* des bactéries Gram-négatives comprend une grande diversité de systèmes et certaines bactéries, comme le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, en possèdent plusieurs (Tableau 5).

Le système le plus commun parmi les bactéries Gram-négatives repose sur les molécules auto-inductrices-1 (AI-1) qui sont de la famille des Acyl-Homosérine Lactones (AHLs). Elles sont constituées par (i) une chaîne acyle, hydrophobe, dont la longueur varie de 4 à 18 carbones, (ii) portées par un noyau homosérine lactone. Le troisième carbone de la chaîne acyle peut porter différents degrés d'oxydation, être lié à un proton ou porter une double liaison avec un atome d'oxygène, formant ainsi une fonction cétone (Chhabra *et al.* 2005). Les variations de la longueur de la chaîne et de ses modifications aboutissent à différentes AHLs et leur confèrent leur spécificité d'espèce (Galloway *et al.* 2011). Plus récemment, d'autres classes d'homosérine lactones, telles que les p-coumaroyl-homosérine lactones ou les Cinnamoyl-homosérine lactones ont été mises en évidence (Schaefer *et al.* 2008; Ahlgren *et al.* 2011).

Le premier système décrit, et considéré comme modèle, est celui de *Vibrio fischeri*, LuxI/LuxR (Figure 18) : la N-3-oxohexanoyl-homoserine lactone (ou 3-oxo-C6-HSL) est synthétisée par la protéine LuxI, puis diffuse librement dans et hors de la cellule. La concentration de l'AHL augmente proportionnellement avec la densité bactérienne. Au-delà d'une concentration seuil de l'AHL, la liaison avec son récepteur LuxR est productive. Le complexe Ligand-Récepteur reconnaît une séquence consensus (lux box) en amont de l'opéron *luxICDABE* (*luxAB* codant la luciférase) et active son expression (Stevens *et al.* 1994). De plus, le système comprend une boucle de rétro-contrôle positive puisque l'expression du gène *luxI* lui-même est activée par le complexe AHL-LuxR, promouvant ainsi la synergie de l'activation du QS à l'échelle de la population.

La protéine LuxI, ou ses homologues, catalyse la synthèse des AHLs en formant une liaison amide entre la chaîne carbonée (portée par une *acyl-Acyl Carrier Protein*, acyl-ACP) et le groupement amine d'une S-adenosyl-méthionine (SAM). Le noyau lactone est ainsi formé par la libération d'un groupe 5'-methylthioadenosine (5'-MTA) (Moré *et al.* 1996).

Un grand nombre de systèmes homologues (pour les gènes de synthèse et de récepteurs) ont été décrits dans de nombreuses bactéries Gram-négatives, notamment dans près de 70 espèces appartenant au phylum des Proteobacteria (Case *et al.* 2008).

	Molécule auto-inductrice	Exemple d'organisme source	Système de QS	Processus régulés	Référence
Gram +	<i>AutoInducer Peptide (AIP)</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>agr</i> <i>agr</i> <i>agr</i> <i>FsR</i> <i>com</i>	Virulence Virulence Virulence Virulence Compétence	(Novick <i>et al.</i> 1995) (Autret <i>et al.</i> 2003) (Ohtani <i>et al.</i> 2009) (Sifri <i>et al.</i> 2002) (Magnuson <i>et al.</i> 1994)
	γ -butyrolactone	Genre <i>Streptomyces</i>	<i>scb</i> <i>scg</i>	Antibiotiques Métabolisme	(Takano <i>et al.</i> 2001) (Du <i>et al.</i> 2011)
Gram -	AI-1 (Acyl-Homoserine Lactones)	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Vibrio harveyi</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LuxI/LuxR LuxLM/LuxN LasI/LasR RhII/RhIR	Luminescence Luminescence & Virulence Virulence & Biofilm	(Engebrecht <i>et al.</i> 1984) (Mok <i>et al.</i> 2003) (Waters <i>et al.</i> 2006) (Gambello <i>et al.</i> 1991; Gambello <i>et al.</i> 1993; Winson <i>et al.</i> 1995; Chapon-Hervé <i>et al.</i> 1997)
	PQS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PqsABCD/ PqsR	Régulation du QS Pyocyanine Homéostasie du fer Virulence Biofilm	(Pesci <i>et al.</i> 1999) (Gallagher <i>et al.</i> 2002) (Bredenbruch <i>et al.</i> 2006; Diggle <i>et al.</i> 2007) (Cao <i>et al.</i> 2001; Gallagher <i>et al.</i> 2002) (Diggle <i>et al.</i> 2003)
	IQS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AmbBCDE/ IqsR	Réponse au stress	(Lee <i>et al.</i> 2013)
	CAI	<i>Vibrio (cholerae)</i>	CqsA/CqsS	Virulence	(Ng <i>et al.</i> 2011)
	AI-3	EHEC O157:H7 EPEC O26:H11 AIEC LF82 <i>Escherichia coli</i> MG1655 <i>Escherichia coli</i> BW25113 <i>Salmonella enterica</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Yersinia sp.</i>	Qse/QseBC Qse/? ? ? Qse/? Qse/? Qse/?	Attachement-Effacement ? ? ? ? ?	(Sperandio <i>et al.</i> 2003; Walters <i>et al.</i> 2006a; Kim <i>et al.</i> 2020) (Kim <i>et al.</i> 2020; Kaper <i>et al.</i> 2005) (Kim <i>et al.</i> 2020) (Kim <i>et al.</i> 2020) (Kim <i>et al.</i> 2020) (Kaper <i>et al.</i> 2005; Walters <i>et al.</i> 2006c; Kim <i>et al.</i> 2020)
	AI-2	<i>Vibrio harveyi</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> EHEC <i>Salmonella enterica</i>	LuxS/LuxPQ LuxS/LuxPQ LuxS/LuxPQ LuxS/LsrB ? LuxS/LsrB	Bioluminescence, TSS, protéase Virulence & Biofilm ? Attachement-Effacement Pathogénicité et invasion	(Schauder <i>et al.</i> 2001b; Mok <i>et al.</i> 2003; Surette <i>et al.</i> 1999) (Schauder <i>et al.</i> 2001b; Zhu <i>et al.</i> 2002; Hammer <i>et al.</i> 2003) (Schauder <i>et al.</i> 2001b) (Bansal <i>et al.</i> 2008; Schauder <i>et al.</i> 2001b; Surette <i>et al.</i> 1999) (Choi <i>et al.</i> 2012; Miller <i>et al.</i> 2004; Schauder <i>et al.</i> 2001b)

Tableau 5 : Vue d'ensemble de molécules auto-inductrices (AI) du quorum sensing bactérien et des systèmes correspondants dans quelques exemples de bactéries (liste non exhaustive). Dans la colonne 'Système de QS', les systèmes de bactéries Gram-négatives et inter-espèces (AI-2) sont dénommés par (i) la synthase (exemple : LuxI), (ii) le récepteur de la molécule auto-inductrice (exemple : LuxR), tel que LuxI/LuxR. Un point d'interrogation indique que le récepteur n'a pas été clairement identifié ou que les processus régulés ne sont pas connus ou démontrés. Les bactéries entéropathogènes sont indiquées en rouge. AI-1/2/3 : *AutoInducer*-1/2/3 ; PQS : *Pseudomonas* Quinolone Signal ; IQS : *Integrated Quorum Sensing* ; CAI : *Cholera AutoInducer*-1 ; EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique ; EPEC : *Escherichia coli* entéropathogène ; AIEC : *Escherichia coli* adhérente-invasive.

La bactérie ubiquitaire *Pseudomonas aeruginosa* est probablement l'un des organismes dont les mécanismes de QS ont été les plus étudiés, notamment dans le cadre de sa pathogénicité opportuniste (Lee *et al.* 2015). Elle possède quatre systèmes de QS (Tableau 5), organisés en réseau, dont deux sont homologues de celui de *Vibrio fischeri* et impliquent des AHLs (Lee *et al.* 2015) : le système LasI/LasR qui produit et reconnaît la N-3-oxododecanoyl-homosérine lactone (ou 3-oxo-C12) et le système RhlI/RhlR qui synthétise et reconnaît la N-butanoyl-homosérine lactone (ou C4-HSL) (Figure 18). Ces deux systèmes activent la synthèse de l'AHL auto-inductrice, dans le cadre d'une boucle de rétro-contrôle positif.

Le troisième système de QS de *P.aeruginosa*, identifié en 1999 (Pesci *et al.* 1999), est basé sur la molécule PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal, de structure 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone), son récepteur PqsR (Cao *et al.* 2001) et les enzymes de biosynthèse PqsABCD et PqsH (Gallagher *et al.* 2002).

Le dernier système a été identifié plus récemment (Lee *et al.* 2013) et repose sur la molécule IQS (*Integrated Quorum Sensing*), et son récepteur IqsR (et les enzymes de synthèse AmbBCDE). La production d'IQS est contrôlée par le système LasI/LasR, en conditions 'basales', mais également en réponse à des stress environnementaux (notamment la restriction en phosphate) (Lee *et al.* 2013).

Ces quatre systèmes fonctionnent ensemble de façon hiérarchisée dans la souche modèle d'étude PAO1 (Lee *et al.* 2015). Brièvement et de façon très simplifiée, en haut de la cascade de signalisation, se trouve le système LasI/LasR qui, une fois induit, régule positivement l'expression du système RhlI/RhlR (y compris leurs boucles respectives de rétrocontrôle positif), du système PqsR/ PqsABCD-PqsH et du système IQS. De façon intéressante, le système RhlI/RhlR régule négativement le module PqsR/ PqsABCD-PqsH tandis que ce dernier participe à l'activation du premier. Ces mécanismes permettent une modulation fine du QS dans *P. aeruginosa*.

Plus de 300 gènes sont régulés par le QS de *P. aeruginosa* (Schuster *et al.* 2003) : nombre d'entre eux sont impliqués dans l'expression de facteurs de pathogénicité dont, entre autres, une élastase (Gambello *et al.* 1991), une protéase (Kessler *et al.* 1993), la phosphatase alcaline et l'exotoxine A (Gambello *et al.* 1993). La formation de biofilms est également régulée par le QS (Davies *et al.* 1998 ; Chapon-Hervé *et al.* 1997). En plus de son rôle de régulation du système, le PQS est également impliqué dans l'homéostasie du fer (Bredenbruch *et al.* 2006; Diggle *et al.* 2007), la production de facteurs participant à la virulence (Cao *et al.* 2001 ; Gallagher *et al.* 2002) et la formation de biofilms (Diggle *et al.* 2003).

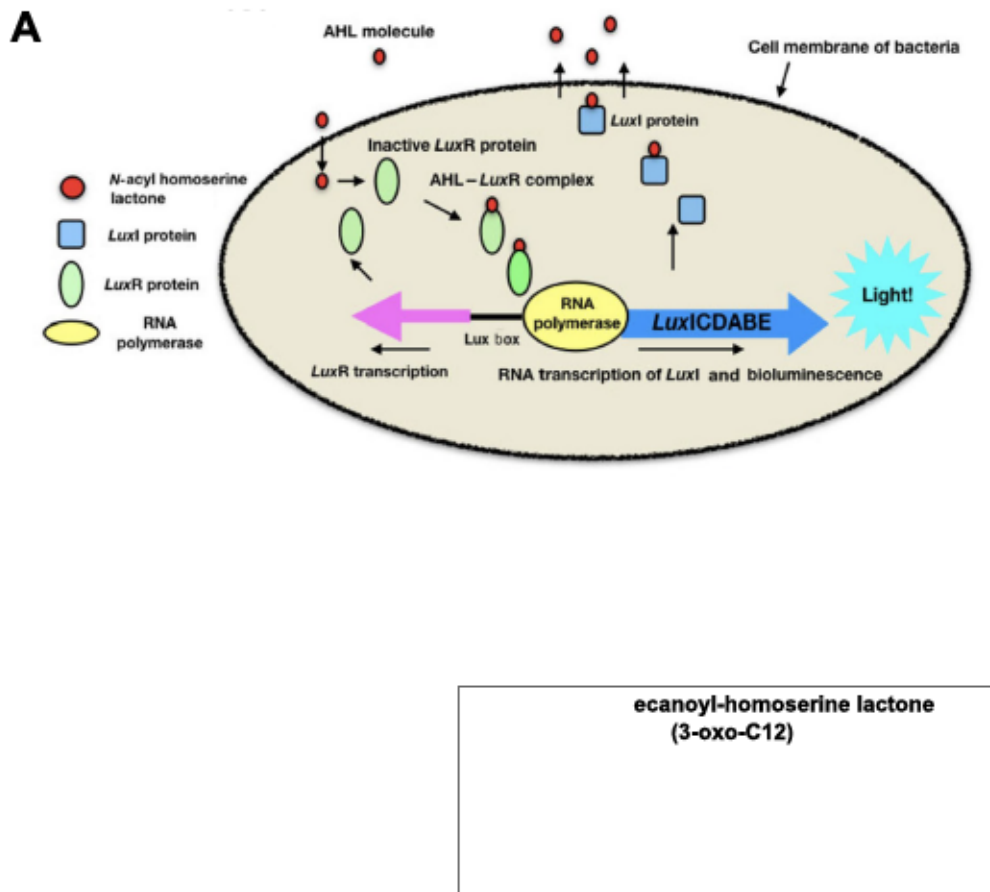


Figure 18 : Le Quorum Sensing (QS) de type AI-1. (A) Fonctionnement du QS de *Vibrio fischeri*, modèle du QS de type AI-1. L’AHL est synthétisée par la protéine LuxI, puis diffuse librement dans la cellule et en dehors. Au-delà d’une concentration seuil, la liaison avec son récepteur LuxR est active. Le complexe Ligand-Récepteur reconnaît une séquence consensus (*lux box*) en amont de l’opéron *luxICDABE* (*luxAB* codant la luciférase) et active son expression (adapté de Prescott *et al.* 2020). **(B) Structure des N-Acyl Homosérines Lactones.** Au milieu, la structure générale des AHLs : en bleu le noyau homosérine lactone, en vert la chaîne acyl dont le nombre de carbones (n) peut varier, en rouge le degré d’oxydation (R pouvant être O, OH, H). Les deux AHLs produites par *P. aeruginosa* figurent en bas : la C4-HSL (à gauche) et l’AHL 3-oxo-C12 (ou 3-oxo-C12-HSL, à droite). Ces formules sont reproduites d’après la thèse de doctorat d’Agathe Peyrottes, avec son autorisation.

Enfin, un dernier système de QS des bactéries Gram-négatives est celui basé sur la molécule auto-inductrice AI-3 (Tableau 5), identifiée dans la souche entérohémorragique d’*Escherichia coli* sérotype O157:H7 (Sperandio *et al.* 2003). Cette molécule régule le système Qse qui conduit à l’activation de la transcription, d’une part, d’un régulon du flagelle, et d’autre part, des gènes de l’îlot de pathogénicité LEE (pour *Locus of Enterocyte Effacement*) (Carlson-Banning *et al.* 2018; Walters *et al.* 2006b). Depuis sa découverte, la structure d’AI-3 était inconnue mais il était supposé qu’elle soit similaire à celle de l’adrénaline et de la noradrénaline, qui sont des agonistes de son récepteur (Sperandio *et al.* 2003). Une étude très récente a permis d’isoler et de caractériser AI-3 et différents analogues de la famille des pyrazinones (Kim *et al.* 2020). De façon intéressante, les auteurs montrent la prédominance d’un analogue *in vivo* dans les fèces de souris, mais également que de nombreuses souches bactériennes Gram-négatives mais aussi positives (notamment *S. aureus*, *E. faecalis* et *B. subtilis*) produisent ces molécules,

apportant ainsi de nouveaux éléments sur la spécificité d'AI-3, qui ne semble pas restreinte aux bactéries Gram-négatives. Les auteurs confirment également la production d'analogues AI-3 par diverses bactéries dont les entéropathogènes *Shigella flexneri*, *Salmonella sp.*, *Yersinia sp.*, dans lesquelles l'existence de la voie de signalisation AI-3/Adrénaline/Noradrénaline avait été suggérée, bien qu'il s'agissent de résultats non publiés uniquement mentionnés dans des revues du groupe (Kaper *et al.* 2005; Walters *et al.* 2006c).

c. *Quorum sensing* inter-espèce : AI-2

Enfin, nous présenterons un dernier type de QS (Tableau 5), basé sur AI-2, qui a été mis en évidence initialement dans les bactéries Gram-négatives *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae* ainsi qu'*Escherichia coli* entérohémorragique, mais également dans des bactéries Gram-positives notamment *Salmonella enterica* (Schauder *et al.* 2001a; Surette *et al.* 1999). Depuis, de nombreuses espèces ont été reportées comme utilisant ce système pour réguler une grande diversité de phénotypes (Pereira *et al.* 2013). Ce système repose sur un groupe de molécules, AI-2, dont deux structures ont été identifiées jusqu'ici : le S-THMF-borate (pour (2S,4S)-2-méthyl-2,3,3',4-tetrahydroxy-tetrahydrofurane-borate) dans *Vibrio harveyi* (Chen *et al.* 2002) et le R-THMF (pour (2R,4S)-2-méthyl-2,3,3',4-tetrahydroxytetrahydrofurane) identifié dans *Salmonella* (Miller *et al.* 2004). Ce système est proposé comme un moyen de communication poly-espèces (Pereira *et al.* 2013).

La démonstration de l'existence du QS a pendant longtemps été restreinte au monde bactérien. Il a été montré plus récemment que les champignons peuvent également communiquer selon ce 'langage' (présenté dans les deux revues récentes suivantes Barriuso *et al.* 2018; Padder *et al.* 2018). De même, une étude de 2019 a permis de montrer que le bactériophage de *Vibrio cholerae* possède un récepteur à la molécule auto-inductrice bactérienne DPO et que celle-ci régule la transition entre le cycle lysogénique et lytique du phage (Silpe *et al.* 2019). Nous n'aborderons pas ces deux aspects du QS 'inter-règne', qu'il est néanmoins important de mentionner dans le contexte de l'écosystème intestinal.

Ainsi, la diversité, hiérarchisation et polyvalence des molécules auto-inductrices et des systèmes de QS illustrent la complexité des moyens de communication des organismes unicellulaires, entre autres bactériens, qu'ils soient spécifiques à certaines espèces ou poly-espèces et l'importance qu'ils peuvent avoir dans des écosystèmes ayant une grande diversité microbienne tels que le microbiote intestinal. De plus, la mise en évidence de nouveaux

mécanismes, molécules et systèmes au cours des années ont sans cesse remis en question les modèles établis et ont montré que le dialogue par le *quorum sensing* était plus universel qu'initialement pensé, au sein du monde microbien mais également avec le monde eucaryote, suggérant ainsi un **dialogue inter-règne**, que nous allons maintenant aborder.

B. DIALOGUE INTER-REGNE : EFFETS DES AHLs SUR LES CELLULES EUCARYOTES

La multiplication des connaissances sur le *quorum sensing* a permis de mettre en évidence sa versatilité, et l'étendue des espèces entre lesquelles il permet le dialogue. Eu égard à l'intérêt grandissant pour les interactions hôte-microbiote, notamment intestinal, de plus en plus d'études ont souligné la possibilité d'une communication hôte-bactéries médiée par le QS, dans le cadre d'un **dialogue inter-règne** (Holm *et al.* 2014; Pacheco *et al.* 2009). Bien qu'ils aient été démontrés pour différents types de QS, notamment récemment pour AI-3 (Kim *et al.* 2020), les effets potentiels de molécules du QS sur l'hôte eucaryote ont majoritairement été étudiés dans le cadre du QS de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* et des Acyl-Homosérine Lactones (AHLs) (Cooley *et al.* 2008; Guo *et al.* 2020; Liu *et al.* 2015b; Rumbaugh *et al.* 2012).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie aérobie ubiquitaire et pathogène opportuniste dont les infections chroniques représentent un des principaux facteurs de mortalité chez les malades de mucoviscidose (Gibson *et al.* 2003; Zemanick *et al.* 2011; Faure *et al.* 2018) et la cause d'infections sérieuses chez les sujets atteints du VIH/SIDA (Manfredi *et al.* 2002). Sa large antibiorésistance et sa capacité à évoluer dans de **nombreuses niches écologiques** en font également l'un des principaux pathogènes responsables des maladies nosocomiales (Ariffin *et al.* 2004), notamment dans le cas d'infections aiguës causées par des dispositifs thérapeutiques (respirateurs, sondes urinaires, cathéters) (Weinstein *et al.* 2005).

Comme montré précédemment, la diversité et la complexité du QS dans *P. aeruginosa* participe activement à sa virulence, pathogénicité et sa capacité à infecter l'hôte (Liu *et al.* 2015b). Son système de QS participe à sa pathogénicité aussi par ses effets directs sur l'hôte. Dans le cadre de ce travail, nous nous concentrerons plus particulièrement sur les effets de l'AHL 3-oxo-C12 de *P. aeruginosa*, dont il a été montré *in vitro* qu'elle pénètre dans les cellules eucaryotes de la lignée COS-1 (Williams *et al.* 2004) et dans des cellules dendritiques et lymphocytes T murins primaires et immortalisés (Ritchie *et al.* 2007). Les nombreux effets, notamment sur l'inflammation, la viabilité cellulaire de l'hôte et les barrières épithéliales de cette AHL sont reportés en Tableau 6.

i. Effets immunomodulateurs

La littérature concernant les propriétés immunomodulatrices de l’AHL 3-oxo-C12 n’est pas toujours cohérente et certaines études montrent des effets qui peuvent sembler contradictoires, entre pro ou anti-inflammatoires. Ceci est en partie dû à la diversité des modèles employés, notamment cellulaires, et des conditions expérimentales. Nous aborderons ici quelques exemples de ces résultats, qui sont reportés en Tableau 6 (incluant, pour plus de précisions et clarté, les modèles et doses expérimentales).

L’une des premières études ayant montré les propriétés immunomodulatrices spécifiquement de l’AHL 3-oxo-C12, dont les caractéristiques varient avec la dose, date de 1998 (Telford *et al.* 1998) : les auteurs montrent que la molécule inhibe la production de TNF α et d’IL-12 (une cytokine impliquée dans la réponse type Th1) par des macrophages activés au LPS mais qu’à faible concentration, elle induit l’augmentation de la production d’IgG1 (indicateur d’une réponse type Th2 chez la souris). Une autre étude montre que l’AHL active et favorise la différenciation des lymphocytes T naïfs vers un phénotype type Th1 (Smith *et al.* 2002). A l’inverse, l’étude de Ritchie *et al.* (2005) montre que l’AHL 3-oxo-C12 inhibe la différenciation des lymphocytes T isolés de rate de souris en Th1 ou Th2 (Tableau 6).

Concernant l’expression ou production de cytokines, les effets de l’AHL 3-oxo-C12 semblent converger vers une tendance à la diminution de celles-ci dans des cellules immunitaires comme des macrophages (Telford *et al.* 1998), des lymphocytes T (Ritchie *et al.* 2005; Smith *et al.* 2002), ou, de façon plus générale, des cellules mononuclées (Bao *et al.* 2017; Hooi *et al.* 2004). En revanche, dans des lignées de fibroblastes et de cellules épithéliales (Jahoor *et al.* 2008; Shiner *et al.* 2006; Smith *et al.* 2001), ou dans la peau *in vivo* chez la souris (Smith *et al.* 2002), l’exposition à l’AHL 3-oxo-C12 à différentes doses induit l’expression ou la production de diverses chimiokines et cytokines (Tableau 6).

La voie de signalisation NF- κ B, impliquée dans la réponse pro-inflammatoire (Liu *et al.* 2017), est activée en présence de l’AHL 3-oxo-C12 dans des lignées de cellules épithéliales pulmonaires (Smith *et al.* 2001) et dans des kératinocytes isolés à partir de souris soumises à une injection intradermique de l’AHL (Smith *et al.* 2002). La voie NF- κ B est au contraire inhibée dans des macrophages murins et *in vivo* chez la souris (mesure de la bioluminescence émise par un système rapporteur sur l’organisme entier) (Kravchenko *et al.* 2008).

Outre son rôle immunomodulateur parfois ambigu, l'AHL 3-oxo-C12 exerce des effets plus clairs sur la **migration cellulaire**. En effet, plusieurs études *in vitro* (Tableau 6) ont montré des propriétés chimiotactiques sur les neutrophiles humains (Wagner *et al.* 2007; Zimmermann *et al.* 2006). De façon intéressante, la C4-HSL, autre AHL produite par *P. aeruginosa*, n'induit pas ces effets, suggérant ainsi le rôle des longues chaînes acyl. De plus, ce rôle sur l'induction ou l'augmentation de la migration des neutrophiles implique un effet de remodelage du cytosquelette d'actine médié par les petites GTPases Rac1 et Cdc42 (Karlsson *et al.* 2012a). Ce dernier point a également été confirmé dans des cellules épithéliales, dans la lignée entérocytaire Caco-2 (Karlsson *et al.* 2012b).

ii. Effets sur la viabilité cellulaire

De nombreuses études corroborent des **effets cytotoxiques**, notamment pro-apoptotiques, de la 3-oxo-C12 produite par *P. aeruginosa* dans différents types cellulaires *in vitro* (Holban *et al.* 2014; Neely *et al.* 2017; Schwarzer *et al.* 2012; Shiner *et al.* 2006; Taguchi *et al.* 2014; Tao *et al.* 2016; Tao *et al.* 2018; Tateda *et al.* 2003). On peut néanmoins noter que ces effets sont le plus souvent observés à des concentrations considérées comme élevées, bien que certaines lignées soient plus sensibles que d'autres (Tableau 6). De nouveau, plusieurs de ces groupes montrent que l'autre AHL de *P. aeruginosa*, la C4-HSL à chaîne courte n'exerce pas ces effets délétères sur la viabilité cellulaire (Holban *et al.* 2014; Schwarzer *et al.* 2012; Tao *et al.* 2016; Tateda *et al.* 2003).

Effets immunomodulateurs	Modèle	Dose	Référence
Diminution de la production de TNF α	Macrophages murins ¹	40-70 μ M	(Telford <i>et al.</i> 1998)
Diminution de la production d'IL-12		0.1-100 μ M	
Diminution de la production d'anticorps à forte dose vs augmentation à faible dose	Cellules de rate murines ¹	>80 μ M vs 10-70 μ M	(Telford <i>et al.</i> 1998)
Diminution de la production d'IL-4 et d'IFN γ	Lymphocytes T murins ²	5 μ M	(Ritchie <i>et al.</i> 2005)
Inhibition de la différenciation Th1 ou Th2			
Activation des Lymphocytes T naifs et différenciation vers un phénotype Th1	Lymphocytes T murins ²	5 μ M	(Smith <i>et al.</i> 2002)
Diminution de la prolifération	PBMCs humaines	6-55 μ M	(Hooi <i>et al.</i> 2004)
Diminution de la production d'IL-2		37-55 μ M	
Diminution de la production de TNF α		50 μ M	
Augmentation de l'expression de TLR2 et TLR4	PBMCs humaines	1-100 μ M (dose-dépendant)	(Bao <i>et al.</i> 2017)
Augmentation de la viabilité (prolifération ?)			
Diminution de la production de TNF α			
Inhibition de la voie de signalisation NF- κ B en réponse au LPS	Macrophages ³ & <i>in vivo</i>	4.7 μ M	(Kravchenko <i>et al.</i> 2008)
Augmentation de la phagocytose et activation de la voie de signalisation p38 MAPK	Macrophages humains ⁴	100 μ M	(Vikström <i>et al.</i> 2005)
Induction de la production d'IL-8, translocation nucléaire de NF- κ B (activation) via l'activation de la voie de signalisation MAPK-ERK	Lignées 16HBE, A549, L828 ⁵	100 μ M	(Smith <i>et al.</i> 2001)
Inflammation locale avec infiltrat inflammatoire			
Augmentation des taux d'ARNm des chimiokines MIP-1 β , MIP-2, MCP-1, IP-10, des cytokines IL-1 α et IL-6, et de l'enzyme Cox-2	Injection intradermale (souris)	1-100 μ M	(Smith <i>et al.</i> 2002)
Activation de la voie NF- κ B	Kératinocytes de souris traitées	1-100 μ M	(Smith <i>et al.</i> 2002)
Augmentation des taux d'ARNm des cytokines IL-1 α , IL-6, IL-8 (humaine) ou CXCL1 (murine) et de l'enzyme Cox-2	Lignées A549 ⁵ et NIH3T3 ⁶	10-200 μ M	(Jahoor <i>et al.</i> 2008)
Augmentation des taux d'ARNm des cytokines IL-6, CXCL1 et de l'enzyme Cox-2	Lignée NIH3T3 ⁶	100-250 μ M	(Shiner <i>et al.</i> 2006)
Augmentation de l'expression des récepteurs CD11b/CD18, CD16 et CD64 et phagocytose	PMN humains ⁷	10 μ M	(Wagner <i>et al.</i> 2007)
Cascade de signalisation impliquant les kinases TK, MAPK et PKC et la phospholipase C (PLC)	PMN humains ⁷	0.01-100 μ M	(Zimmermann <i>et al.</i> 2006)
Activation de PLC et mobilisation du Ca ²⁺ intracellulaire. Phosphorylation de Rac et Cdc42	PMN humains ⁷	12.5-100 μ M	(Karlsson <i>et al.</i> 2012a)
Remodelage du cytosquelette d'actine			
Effets sur la viabilité cellulaire	Modèle	Dose	Référence
Induction de l'apoptose dans les deux lignées, avec libération du Ca ²⁺ intracellulaire	Lignées NIH3T3 et HUVEC ⁸	100 ou 10 μ M	(Shiner <i>et al.</i> 2006)
Cytotoxicité dose-dépendante (mais pas dans des lignées de cellules épithéliales)	Macrophages ³ et lignées U-937 et P388D1 ⁹	12-50 μ M	(Tateda <i>et al.</i> 2003)
La C4-HSL n'a pas ces effets			
Induction rapide de l'apoptose, indépendante du canal chlorique CFTR	Lignées JME/CF15 et Calu3 ¹⁰	10-100 μ M	(Schwarzer <i>et al.</i> 2012)
La C4-HSL n'a pas ces effets			
Mort par apoptose (voie intrinsèque mitochondrie-dépendante)	MEFs ¹¹	25-100 μ M	(Neely <i>et al.</i> 2017)
Induction de l'apoptose et nécrose et production d'IL-1 β , IL-8 et TNF α	MSCs humaines	50 μ M	(Holban <i>et al.</i> 2014)
La C4-HSL n'a pas ces effets			
Induction d'un dysfonctionnement mitochondrial et de l'apoptose	Lignée LS174T ¹²	100 μ M	(Tao <i>et al.</i> 2016; Tao <i>et al.</i> 2018; Tao <i>et al.</i> 2019)
La C4-HSL n'a pas ces effets			
Réduction de la viabilité cellulaire	Lignée Caco-2 ¹³ non différenciée	30-100 μ M	(Taguchi <i>et al.</i> 2014)
La Mucine 3 est protectrice			

Suite du tableau et légende page suivante

Effets sur la barrière épithéliale		Modèle	Dose	Référence
Effets sur la migration	Augmentation de la migration aux faibles dose vs inhibition de la migration à 200µM Interaction avec IQGAP1 et augmentation de la phosphorylation de Rac1/Cdc42	Lignée Caco-2 ¹³ polarisée	1.5-12µM vs 200µM	(Karlsson <i>et al.</i> 2012b)
Effets sur la perméabilité et les jonctions intercellulaires	Augmentation de la perméabilité aux ions et macromolécules Activation des kinases p38 et p42/44 et de la signalisation calcique. Désassemblage des jonctions serrées et adhérentes <i>via</i> des modifications de leur état de phosphorylation.	Lignée Caco-2 ¹³ polarisée	100-200µM	(Vikstrom <i>et al.</i> 2010; Vikstrom <i>et al.</i> 2009; Vikstrom <i>et al.</i> 2006)
	Augmentation de la perméabilité aux macromolécules. Diminution de l'expression et internalisation de l'Occludine et Tricelluline Effets médiés par l'induction de l'expression et par l'activation de MMP-2 et MMP-3 La C4-HSL n'a pas ces effets	Lignée Caco-2 ¹³ polarisée	200-400µM	(Eum <i>et al.</i> 2014)
	Augmentation de la perméabilité aux ions	Lignée VA10 ¹⁴ air-liquide	100µM	(Halldorsson <i>et al.</i> 2010)
	Augmentation de la perméabilité aux ions Internalisation de ZO-1 Libération du Ca ²⁺ intracellulaire et apoptose	Lignée Calu3 ¹⁰ polarisée	100µM	(Schwarzer <i>et al.</i> 2014)
Effets sur les mucines	Diminution de la production de Mucine 2 (avec apoptose) dans les cellules LS174T (100µM) vs augmentation dans la lignée HCT116 (100µM) La C4-HSL n'a pas ces effets	Lignée LS174T ¹² et HCT116 ¹⁵	100µM vs 400µM	(Tao <i>et al.</i> 2016)
	Diminution des taux d'ARNm de MUC3	Lignée Caco-2 ¹³ non différenciée	30µM	(Taguchi <i>et al.</i> 2014)

Tableau 6 : Vue d'ensemble des effets de l' AHL 3-oxo-C12 sur les cellules eucaryotes, dans différents types cellulaires, sur des paramètres inflammatoires, sur la viabilité cellulaire et sur la fonction de barrière épithéliale. ¹ Les macrophages murins et les cellules de rate murines sont des cultures primaires *in vitro*. ² Les Lymphocytes T murins sont isolés à partir de la rate de souris. PBMCs : cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*). ³ Les macrophages sont isolés et différenciés *in vitro* à partir de moelle osseuse de souris. ⁴ Les macrophages sont différenciés *in vitro* à partir de monocytes isolés du sang humain. ⁵ Les cellules 16HBE (*Human Bronchial Epithelial*) sont une lignée de cellules épithéliales bronchiques et les cellules A549 une lignée humaine de cellules épithéliales alvéolaires tandis que les cellules L828 sont une lignée non transformée de fibroblastes humains normaux. ⁷ PMN humains : Neutrophiles PolyMorphonucléaires (culture primaire *in vitro* à partir de sang humain) ⁸ Les cellules NIH3T3 sont une lignée immortalisée de fibroblastes murins. Les cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) sont une lignée de cellules endothéliales. ⁹ Les cellules U-937 et P388D1 sont des lignées de monocytes. ¹⁰ Les cellules JME/CF15 sont une lignée de cellules épithéliales nasales transformées et exprimant un allèle muté du canal chlorure CFTR, utilisées comme modèle de mucoviscidose *in vitro* tandis que la lignée Calu3 correspond à des cellules épithéliales humaines glandulaires des voies respiratoires immortalisées. ¹¹ Les cellules MEFS (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) sont une lignée immortalisée de fibroblastes murins. ¹² Les cellules LS174T sont une lignée humaine de cellules du colon d'origine cancéreuse, présentant un phénotype de cellules à mucus. ¹³ Les cellules Caco-2 sont une lignée de cellules épithéliales humaines isolées à partir d'un adénocarcinome colorectal présentant un phénotype d'entérocytes. ¹⁴ Les cellules VA10 sont une lignée immortalisée de cellules épithéliales bronchiques, cultivées dans ce cas à l'interface air-liquide. ¹⁵ Les cellules HCT116 sont une lignée de cellules du colon d'origine cancéreuse. TK : Tyrosine Kinase ; PLC : PhosphoLipase C ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; PKC : Protéine Kinase C ; Nuclear Factor-kappa B ; CXCL1 : Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1; ERK : Extracellular-signal Regulated Kinase ; CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator ; MMP-2/-3 : Matrix MetalloProteinase-2/-3 ; IQGAP1 : IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1.

iii. Effets sur la fonction de barrière épithéliale

Outre les effets de l’AHL 3-oxo-C12 sur la migration des cellules épithéliales déjà évoqués (Karlsson *et al.* 2012b), cette molécule a été particulièrement étudiée pour son rôle délétère sur la barrière épithéliale. En effet comme mentionné précédemment, *P. aeruginosa* est une bactérie infectant divers épithélias avec, d'une part et le plus couramment, les infections chroniques de l'épithélium pulmonaire chez les sujets atteints de mucoviscidose et d'autre part les infections aiguës nosocomiales iatrogéniques de l'épithélium pulmonaire (respirateurs), urinaire (sondes) ou encore cutané (dans les cas plus rares de brûlures ou d'abcès). Ainsi, lors d'infections aiguës, ce pathogène opportuniste profite souvent d'une fragilité de la barrière cutanée ou pulmonaire et infecte ces dernières par de nombreux moyens (Golovkine *et al.* 2016). Ceux-ci ne se limitent pas aux molécules du QS et impliquent également d'autres facteurs de virulence comme la protéase LasB, les exotoxines son système effecteur de sécrétion de type III (dont l'injection requiert la présence des facteurs de virulence pili de type IV), la cytolysine Exolysine A, ou encore la lectine LecB qui peuvent cibler les jonctions intercellulaires et le cytosquelette comme reporté dans une revue récente (Golovkine *et al.* 2017).

Concernant la molécule du QS, l’AHL 3-oxo-C12, plusieurs groupes (Tableau 6) montrent qu'elle induit une augmentation de perméabilité paracellulaire aux ions et aux macromolécules *in vitro*, dans des modèles de cellules épithéliales intestinales (Eum *et al.* 2014; Vikstrom *et al.* 2010; Vikstrom *et al.* 2009; Vikstrom *et al.* 2006) ou des voies respiratoires (Halldorsson *et al.* 2010; Schwarzer *et al.* 2014).

Cet effet délétère de l’AHL 3-oxo-C12 sur la perméabilité est accompagné d’une altération des jonctions serrées (Tableau 6). En effet, dans la lignée de cellules épithéliales intestinales Caco-2, l’AHL 3-oxo-C12 induit une diminution de l’expression et une délocalisation des protéines de jonctions serrées Occludine, Tricelluline (Eum *et al.* 2014), ZO-1, ZO-3, JAM-A et des protéines de jonctions adhérentes E-Cadhérine et β -Caténine (Vikstrom *et al.* 2010; Vikstrom *et al.* 2009; Vikstrom *et al.* 2006). La protéine adaptatrice ZO-1 est également internalisée dans une lignée de cellules épithéliales des voies respiratoires exposées à l’AHL 3-oxo-C12 (Schwarzer *et al.* 2014).

De plus, certains auteurs rapportent une hyperphosphorylation de l’Occludine, ZO-1, ZO-3, JAM-A, de la E-Cadhérine et β -Caténine sur les résidus Tyrosine (ainsi que Sérine et Thréonine pour la E-Cadhérine et ZO-1) tandis que les résidus Sérine et Thréonine de l’Occludine, JAM-A et de la β -Caténine sont moins phosphorylés (Vikstrom *et al.* 2010; Vikstrom *et al.* 2009).

Ces effets sur les protéines de jonctions, et sur l'augmentation de perméabilité concomitante, sont partiellement abolis suite à un traitement par des inhibiteurs de phosphatases et de kinases (Vikstrom *et al.* 2009) ainsi que par l'inhibition des kinases p38 et p42/44, qui sont activées par l'AHL (Vikstrom *et al.* 2006).

La molécule du QS induit la libération du Ca^{2+} et l'activation de la signalisation calcique dans deux modèles de lignées épithéliales et l'inhibiteur de la calcium-ATPase du réticulum endoplasmique, la Thapsigargine, prévient de l'augmentation de perméabilité induite par l'AHL (Vikstrom *et al.* 2010; Schwarzer *et al.* 2014). Enfin, un autre groupe a montré que l'AHL induit, *in vitro* dans la lignée Caco-2, l'altération des jonctions serrées notamment par l'activation des métalloprotéinases matricielles MMP-2 et -3 *via* la signalisation PAR (Eum *et al.* 2014), dont il a été montré qu'elles peuvent augmenter la perméabilité paracellulaire et dégrader les protéines de jonctions serrées dans d'autres modèles de cellules épithéliales (Yamada *et al.* 2013; Kim *et al.* 2012; Groschwitz *et al.* 2013).

Enfin, deux études ont montré que l'AHL 3-oxo-C12 induit une diminution des taux d'ARNm de MUC3 dans la lignée Caco-2, cultivée à l'état non différencié (Taguchi *et al.* 2014), ainsi qu'une réduction de l'expression et production de Mucine 2 dans une lignée de cellules présentant des caractéristiques de cellules à mucus (Tao *et al.* 2018). On peut néanmoins noter que ces effets vont de pair avec une nette réduction de la viabilité cellulaire dans ces deux modèles, qui peut impacter l'expression de ces mucines (Tableau 6).

On peut préciser que toutes ces études sur la fonction de barrière ont été réalisées avec des concentrations de 3-oxo-C12 élevées (100-400 μM , Tableau 6), sachant que la concentration de cette molécule peut atteindre 630 μM (\pm 380 μM) dans les biofilms de *P. aeruginosa* mais est estimée à seulement 14 nM (\pm 3nM) dans l'effluent de ces biofilms (Charlton *et al.* 2000).

iv. Récepteurs de l'AHL 3-oxo-C12 dans les cellules hôtes

A ce jour, aucun récepteur eucaryote de l'AHL 3-oxo-C12 n'a été clairement identifié permettant d'expliquer tous les effets de la molécule sur l'hôte. L'AHL 3-oxo-C12 est de nature hydrophobe et peut diffuser librement au travers des membranes lipidiques des cellules de mammifères (Ritchie *et al.* 2007; Williams *et al.* 2004). Néanmoins, trois protéines ont été identifiées comme des interactants ou récepteurs potentiels de cette molécule. L'AHL se lie au facteur de transcription PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ*) (Cooley *et al.*

2010) et peut moduler sa fonction *in vitro* (Jahoor *et al.* 2008). L'AHL 3-oxo-C12 interagit également avec la protéine d'échafaudage IQGAP1 et diminue la quantité totale de cette protéine et son taux d'ARNm (Karlsson *et al.* 2012b ; Gaida *et al.* 2016; Kumar *et al.* 2018). Enfin, une interaction avec le récepteur au goût amer T2R38, exprimé dans divers types cellulaires, a également été montrée (Gaida *et al.* 2016; Maurer *et al.* 2015). Ces derniers résultats ont toutefois été contestés par une autre étude (Verbeurgt *et al.* 2017).

v. Dialogue de l'hôte vers la bactérie

La communication inter-règne, dans le cadre du QS, ne se limite pas aux effets des molécules du QS bactérien sur les cellules de l'hôte. Des réponses de populations de bactéries à des molécules de l'hôte ont également été décrites.

Brièvement et pour n'en citer que quelques exemples, les hormones de la famille des catécholamines, l'adrénaline et noradrénaline, sont des analogues de la molécule AI-3 et activent son système de QS, et la transcription subséquente de gènes de virulence notamment dans une souche entérohémorragique d'*E. coli* (Sperandio *et al.* 2003; Walters *et al.* 2006b ; Clarke *et al.* 2006). Étant donné qu'il est suggéré dans certaines revues que ces mécanismes sont conservés dans diverses bactéries entéropathogènes (Kaper *et al.* 2005; Walters *et al.* 2006c), que ces hormones sont présentes notamment dans la lumière du tube digestif (Asano *et al.* 2012) et que les bactéries entériques peuvent y répondre (Lyte *et al.* 2011), ce dialogue est à mentionner dans le contexte des interactions hôte-microbiote dans l'intestin.

Une étude relativement récente (Ismail *et al.* 2016) a montré que la lignée de cellules épithéliales intestinales Caco-2 est capable de sécréter une molécule analogue (ou qui mime) la molécule du QS AI-2 et qui est détectée par deux récepteurs du QS, LuxP et LsrB (Tableau 5); ce "mime" d'AI2 active la transcription de gènes sous le contrôle du QS, y compris dans la bactérie entéropathogène *Salmonella typhimurium*. De façon intéressante, les cellules épithéliales ne secrètent cette molécule que lorsqu'elles sont exposées à la bactérie directement ou indirectement, suggérant que cette dernière produit un facteur stimulant la production de l'analogue épithélial d'AI-2.

Concernant, les mécanismes de défense ou de réponse de l'hôte vis-à-vis des Acyl-Homosérine Lactones (AHLs), certains présentent des propriétés de *quorum quenching*, c'est-à-dire l'inactivation du *quorum sensing*. Les mammifères possèdent notamment la famille d'enzymes ParaOxoNases (PON), qui comprend trois isoformes PON-1, PON-2 et PON-3, impliquées

dans la détoxification (Furlong *et al.* 2016). Les trois PONs présentent des profils d'expression tissulaires différents (Furlong *et al.* 2016). Elles peuvent toutes hydrolyser le noyau lactone des AHL (notamment la 3-oxo-C12) grâce à leur activité lactonase (Teiber *et al.* 2008) bien que la PON-2 présente la meilleure activité d'hydrolyse pour cette molécule (Teiber *et al.* 2008). Cette PON, ubiquitaire, est exprimée dans l'intestin humain et de rat (Levy *et al.* 2007) et est requise pour la dégradation de la 3-oxo-C12 par des cellules épithéliales isolées à partir de la trachée de souris, qui perdent leurs propriétés de *quorum quenching* lorsque les souris sont invalidées pour l'expression de PON-2 (Stoltz *et al.* 2007).

C. MISE EN EVIDENCE DU QUORUM SENSING DANS L'INTESTIN

i. État de l'art de la littérature

L'étude du *quorum sensing* a longtemps été tournée vers les écosystèmes marins ou végétaux, notamment du fait de la découverte de ce mode de communication dans *Vibrio fischeri*, ou dans les bactéries pathogènes de plantes comme *Agrobacterium tumefaciens* ou *Erwinia carotovora*. L'intérêt de la communauté scientifique pour le QS s'est intensifié avec le problème de l'antibiorésistance de pathogènes humains tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Defoirdt 2018; Rutherford *et al.* 2012). Les connaissances croissantes et la multiplication des études portant sur le microbiome intestinal, écosystème unique, ont finalement soulevé la question de l'existence du QS dans l'intestin humain.

Celui-ci a particulièrement été étudié dans le contexte de pathogènes intestinaux, puisqu'en effet le QS est souvent impliqué dans la virulence et pathogénicité bactérienne (Kaper *et al.* 2005). En effet, il a été montré que la souche entérohémorragique d'*Escherichia coli* O157:H7 régule l'expression des gènes impliqués dans son mécanisme d'attachement-effacement par le système AI-3 (Sperandio *et al.* 2003; Walters *et al.* 2006a; Walters *et al.* 2006b). De plus, les souches d'*E. coli* entéro-pathogènes O26:H11, adhérente-invasive LF82, ainsi que les bactéries *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Yersinia sp.* et *Salmonella enterica* produisent des analogues d'AI-3 (Kim *et al.* 2020), bien que les fonctions régulées restent à caractériser. Concernant les bactéries commensales intestinales, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus faecalis* produisent des AI-3, mais il faut toutefois souligner que ce sont des bactéries potentiellement pathogènes opportunistes, responsables d'un nombre croissant d'infections antibiorésistantes (Li *et al.* 2014; Vu *et al.* 2011).

L'existence de gènes homologues de *luxS* (qui participe à la synthèse des molécules de type AI-2) dans près de 30 espèces bactériennes intestinales dont *E. coli*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Enterococcus faecalis*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, et *Klebsiella pneumoniae* (Schauder *et al.* 2001b; Surette *et al.* 1999) et la confirmation de la fonctionnalité de ce système dans certaines de ces bactéries (Tableau 5) soulèvent bien évidemment la question du QS de type AI-2 dans l'intestin. A nouveau, ces bactéries sont bien souvent des pathogènes (ou potentiels). Cependant, un travail de 2008 a montré que les surnageants de différentes cultures de bactéries commensales intestinales (*Bacteroides vulgatus*, *Clostridium proteoclasticum*, *Escherichia coli*, *Eubacterium rectale*, *Lachnospira multipara*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Roseburia intestinalis*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*) activent un système rapporteur d'AI-2 (et que ces bactéries possèdent un gène *luxS*), suggérant l'existence de ce système dans la flore commensale (Lukáš *et al.* 2008). De plus, une élégante étude, utilisant *E. coli* transformée comme vecteur de production d'AI-2 dans l'intestin de souris, a montré que celle-ci modifie la composition du microbiote intestinal, s'oppose à la dysbiose induite par un traitement antibiotique en favorisant l'expansion des bactéries appartenant au phylum des Firmicutes (Thompson *et al.* 2015). Ces arguments sont donc en faveur de l'existence du QS de type AI-2 dans l'intestin de mammifères.

Concernant le QS reposant sur les AHLs dans l'intestin, relativement peu de données existent. L'existence d'un système de réponse aux AHLs, molécules auto-inductrices de type AI-1, a été mise en évidence dans certaines bactéries qui ne possèdent pas de gènes de synthèse et qui sont donc incapables de produire elles-mêmes des molécules de ce QS (Case *et al.* 2008). Ceci est le cas pour les entéropathogènes *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* qui possèdent un homologue du récepteur aux AHLs LuxR, appelé *sdiA*, mais qui ne sécrètent pas d'AHLs. Il a été montré que le récepteur *sdiA* peut répondre aux AHLs et régule la formation de biofilm dans *E. coli* (Yao *et al.* 2006; Wang *et al.* 1991; Lee *et al.* 2007) et la virulence dans *Salmonella typhimurium* (Smith *et al.* 2003; Michael *et al.* 2001). A ce jour, environ 45 bactéries ont été identifiées comme possédant un récepteur homologue *sdiA* sans posséder de gène de synthèse d'AHLs en parallèle - dont diverses souches d'*E. coli*, de *Shigella flexneri* et *Salmonella enterica* spp., Case *et al.* (2008).

Il est proposé que ce système 'de mise sur écoute' (*eavesdropping*) confère un avantage sélectif aux bactéries le possédant (parfois référées comme 'tricheuses'), qui peuvent ainsi profiter des

nombreuses informations de leur environnement, véhiculées par les molécules du QS et provenant d'espèces par exemple compétitrices, sans avoir à dépenser l'énergie nécessaire à la synthèse de ces molécules (Case *et al.* 2008). Étant donné qu'il a été estimé qu'environ 17% des *Proteobacteria* sont potentiellement capables d'utiliser ce mode d'écoute (alors que 26% des bactéries de ce phylum possèdent le système de QS complet), il pourrait donc représenter une part non négligeable des interactions médiées par le QS des AHLs au sein de communautés complexes dans l'écosystème intestinal.

Au sujet des bactéries 'intestinales' ayant un système complet de QS AI-1 et produisant des AHLs, une fois de plus, les connaissances sont limitées à des entéropathogènes : *Yersinia enterocolitica* et *pseudotuberculosis* (Atkinson *et al.* 1999; Throup *et al.* 1995). Alors qu'un travail récent a isolé plusieurs AHLs dans l'intestin de tortue (Akbar *et al.* 2019), seulement deux études ont reporté la présence d'AHLs dans l'intestin de mammifère : chez les ruminants (Hughes *et al.* 2010) et dans des selles d'enfants nouveaux-nés (Kumari *et al.* 2006). Cependant, ces deux travaux reposent sur des systèmes rapporteurs et non pas sur l'identification directe et la caractérisation de la structure des AHLs.

Le manque de données précises a amené la communauté scientifique à s'interroger sur l'existence réelle du QS (notamment reposant sur les AHLs) dans l'écosystème intestinal humain (Swearingen *et al.* 2013). C'est à cette question que notre équipe a souhaité répondre dans une étude récente (Landman *et al.* 2018).

ii. Mise en évidence des AHLs dans l'intestin humain et identification d'une nouvelle forme, l'AHL 3-oxo-C12:2, diminuée dans les MICI

Notre équipe a souhaité démontrer l'existence d'AHLs dans l'écosystème intestinal et analyser s'il pouvait exister des différences entre sujets sains et atteints de MICI, en faisant l'hypothèse que la dysbiose observée dans ces maladies pourrait être liée à un répertoire d'AHLs modifié (Landman *et al.* 2018). Ceci était en partie supporté par des données de réduction de l'activité de PON-1 chez les sujets atteints de MICI en période de poussée (Boehm *et al.* 2009).

A partir de selles de 26 sujets sains et 49 patients atteints de MC (22 sujets) ou RCH (27 sujets), en période de poussée (24 sujets) ou période de rémission (25 sujets), le laboratoire a mis au point une méthode d'extraction des AHLs et de détection par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Celle-ci a permis d'identifier (grâce à leurs ratios m/z distincts) 14 AHLs différentes dans les fèces des sujets (Figure 19A). Parmi ces 14 AHLs, l'une d'entre elles (ratio m/z de 294.2) est prédominante puisqu'elle est retrouvée dans 40% des échantillons, tandis que les autres AHLs ne sont présentes que dans moins de 10 échantillons (Figure 19A).

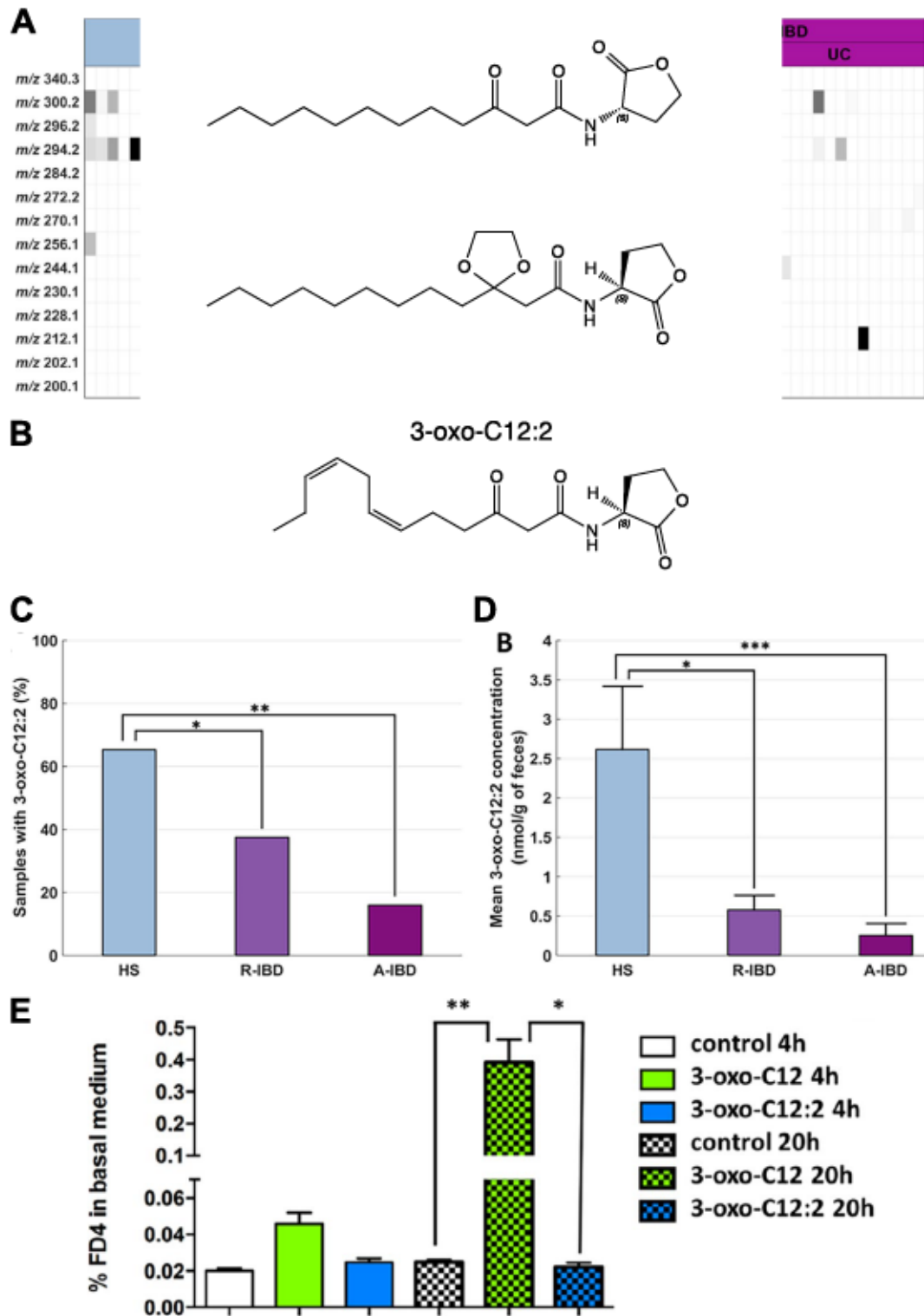


Figure 19 : Identification d’AHLs dans l’écosystème intestinal, dont une AHL prédominante, diminuée dans les MICI (adapté de Landman *et al.* 2018). (A) Heatmap présentant les 14 AHLs différentes identifiées dans les selles de sujets sains (*Healthy subjects*, HS) ou atteints de MICI en période de rémission (R-IBD) ou période de poussée (A-IBD). L’AHL identifiée par le ratio m/z de 294.2 (la 3-oxo-C12:2) est présente dans environ 40% de ceux-ci. (B) Structure de l’AHL 3-oxo-C12:2, dont la position des deux doubles liaisons est hypothétique. L’AHL 3-oxo-C12:2 est diminuée dans les MICI, particulièrement en période de poussée, à la fois (C) en nombre d’échantillons positifs et (D) en concentration de 3-oxo-C12:2 dans les échantillons où elle est détectée. (E) Perméabilité paracellulaire au FITC-dextran 4 kDa (FD4) dans la lignée entérocytaire Caco-2/TC7. L’AHL 3-oxo-C12:2 n’a pas d’effet délétère sur la perméabilité paracellulaire aux macromolécules, contrairement à l’AHL 3-oxo-C12.

Cette molécule n'avait jusqu'alors jamais été décrite et présente bien une activité de *quorum sensing*, comme démontré à l'aide d'un système rapporteur (Landman *et al.* 2018). La caractérisation de sa masse précise a permis de déterminer qu'il s'agit d'une N-3-oxo-dodecanoyl homosérine lactone insaturée avec deux doubles liaisons, et a donc été nommée 3-oxo-C12:2. Sa structure est donc similaire à celle de l'AHL 3-oxo-C12 de *P. aeruginosa*, hormis ses deux doubles liaisons (Figure 19B).

De façon importante, l'AHL 3-oxo-C12:2 est diminuée chez les sujets atteints de MICI et plus particulièrement en période de poussée (Landman *et al.* 2018). Cette diminution se traduit à la fois par un nombre moins important d'échantillons dans lesquels elle est détectée (Figure 19A et C), mais également par une concentration plus faible dans les échantillons positifs pour la 3-oxo-C12:2 (Figure 19D).

Après avoir déterminé que les sujets atteints de MICI présentaient une dysbiose du microbiote intestinal (caractérisée par une réduction de diversité, une diminution des Firmicutes, dont les *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* appartenant à l'ordre des Clostridia) et une expansion des Proteobacteria, ce travail a montré que l'absence de la nouvelle AHL 3-oxo-C12:2 corrèle avec un état de dysbiose. En effet, les données de qPCR d'ADN bactérien montrent que les échantillons négatifs pour la 3-oxo-C12:2 présentent un taux diminué de Firmicutes (dont les groupes *Clostridium coccoides* et *Clostridium leptum* et particulièrement l'espèce de *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii*) et un taux augmenté d'*Escherichia coli*, par rapport aux échantillons dans lesquels l'AHL est retrouvée (Landman *et al.* 2018).

Ainsi, la diminution de l'AHL 3-oxo-C12:2 chez les malades, particulièrement en période de poussée, et le fait que son absence corrèle avec un état de dysbiose, ont amené l'équipe à faire l'hypothèse que cette molécule pourrait exercer un rôle protecteur dans l'écosystème intestinal et éventuellement sur l'hôte, dans le cadre d'un dialogue inter-règne.

Cette nouvelle AHL est structurellement très proche, à l'exception de deux insaturations, de l'AHL 3-oxo-C12 de *P. aeruginosa*, qui présente de très nombreux effets sur l'hôte comme nous l'avons présenté en partie III.B (Tableau 6). Ceci a donc naturellement amené la question d'effets potentiels de l'AHL 3-oxo-C12:2 sur les cellules eucaryotes, en faisant le postulat que ceux-ci pouvaient être différents de ceux de l'AHL 3-oxo-C12. L'étude de 2018 de l'équipe avait en particulier montré que l'AHL 3-oxo-C12:2 exerce des effets anti-inflammatoires dans la lignée de cellules entérocytaires Caco-2/TC7 (Landman *et al.* 2018), renforçant l'hypothèse d'une molécule bénéfique dans l'écosystème.

OBJECTIFS

L'identification récente par notre équipe de la **3-oxo-C12:2** comme AHL naturellement présente dans l'écosystème intestinal est à l'origine du travail de thèse exposé dans ce manuscrit. Le rôle délétère de l'AHL **3-oxo-C12** produite par *P. aeruginosa* sur la fonction de barrière épithéliale, et notamment sur les jonctions intercellulaires, est sans équivoque (Tableau 6). Il était donc indispensable d'étudier les effets de l'AHL **3-oxo-C12:2**, nouvellement identifiée dans l'intestin et structurellement proche, sur la barrière épithéliale : les premiers résultats (Figure 19E) avaient montré qu'elle n'exerce pas, à l'état basal, d'effets délétères sur la barrière épithéliale, contrairement à l'AHL **3-oxo-C12** (Landman *et al.* 2018).

Les MICI étant associées à un défaut de barrière intestinale, et l'AHL **3-oxo-C12:2** étant diminuée dans les MICI, nous nous sommes demandés si cette molécule pouvait exercer des effets bénéfiques sur la fonction de barrière intestinale, dans un contexte inflammatoire. C'est à cette question que mon travail de thèse a essayé de répondre, initialement dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe de Philippe Seksik, qui a identifié l'AHL **3-oxo-C12:2**, et Sophie Thenet, alors membre de l'équipe d'Armelle Leturque au sein de laquelle j'ai débuté ma thèse en 2016. Nous avons ensuite rejoint l'équipe de Philippe Seksik et Harry Sokol en Septembre 2018 où j'ai poursuivi mon projet doctoral.

En parallèle de mon sujet principal, j'ai pu participer à la finalisation d'une étude portant sur la perméabilité intestinale chez les sujets obèses, qui a fait l'objet d'une publication en 2018 présentée en fin de première partie de l'introduction (Genser *et al.* 2018). J'ai également pu participer à la rédaction d'une revue portant sur la plasticité intestinale en réponse aux nutriments et à la chirurgie bariatrique, également publiée en 2018 (Le Gall *et al.* 2018). Ces deux publications, qui sont présentées en annexe, m'ont permis d'aborder la dysfonction de la barrière intestinale dans d'autres pathologies que les MICI, comme l'obésité.

Enfin, après avoir été financé par la région Ile-de-France (CORDDIM) pendant 3 ans, j'ai pu poursuivre en quatrième année de thèse grâce à l'obtention d'un poste d'attaché temporaire d'enseignement et de recherche à l'École Pratique des Hautes Études. Dans ce cadre, j'ai eu l'opportunité de découvrir l'enseignement et mettre à profit les connaissances acquises au cours de mon cursus et de mon doctorat dans des thématiques proches de mon sujet de thèse mais également plus transversales comme la communication scientifique ou encore l'analyse d'images de microscopie et la programmation.

RESULTATS

Ce projet de thèse a visé à étudier les effets de l'AHL 3-oxo-C12:2, nouvellement identifiée, sur la fonction de barrière intestinale, dans un contexte inflammatoire, en les comparant à ceux de l'AHL 3-oxo-C12 produite par le pathogène opportuniste *P. aeruginosa*.

Nous avons tout d'abord abordé cette question par une approche *in vitro* permettant d'étudier les effets des AHLs sur les jonctions intercellulaires et la perméabilité paracellulaire, dont les résultats sont présentés en première partie.

Nos résultats ont montré que la nouvelle AHL 3-oxo-C12:2 n'augmente pas la perméabilité paracellulaire, contrairement à la 3-oxo-C12, qui au contraire aggrave les effets des cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF α sur ce paramètre de la barrière épithéliale. Le résultat majeur de cette étude est que l'AHL 3-oxo-C12:2 préserve l'intégrité des jonctions serrées des effets délétères des cytokines et maintient les interactions entre protéines des complexes jonctionnels à la membrane. De plus, l'augmentation d'ubiquitination des protéines transmembranaires des jonctions serrées induite par les cytokines pro-inflammatoires est prévenue par l'AHL 3-oxo-C12:2, suggérant que cette molécule exerce des effets protecteurs sur la stabilité des jonctions serrées à la membrane plasmique. Ces données sont principalement présentées sous la forme d'un article soumis pour publication au journal *Tissue Barriers*, et sont complétés par quelques résultats complémentaires hors publication.

Nous avons ensuite abordé la question des effets protecteurs de l'AHL sur la barrière intestinale *in vivo*, permettant de prendre en considération l'ensemble des acteurs de la barrière intestinale et ce dans deux contextes : (i) dans un modèle de colite inflammatoire et lors d'expositions longues aux AHLs, permettant d'inclure un éventuel effet sur le microbiote intestinal, (ii) lors d'expositions courtes aux AHLs afin de s'affranchir d'une modification de la composition et des propriétés du microbiote. Ces résultats sont présentés en deuxième partie de ce chapitre de résultats.

I. ÉTUDE *IN VITRO* DES EFFETS DES AHLs SUR LA FONCTION DE BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE

- A. ARTICLE PRINCIPAL : *PROTECTIVE ROLE OF THE 3-OXO-C12:2 ACYL HOMOSERINE LACTONE, A QUORUM SENSING MOLECULE FROM THE GUT MICROBIOTA, ON TIGHT JUNCTION INTEGRITY UNDER INFLAMMATORY CONDITIONS*

MANUSCRIT SOUMIS AU JOURNAL *TISSUE BARRIERS*

**PROTECTIVE ROLE OF THE 3-OXO-C12:2 ACYL HOMOSERINE LACTONE, A QUORUM SENSING
MOLECULE FROM THE GUT MICROBIOTA, ON TIGHT JUNCTION INTEGRITY UNDER INFLAMMATORY
CONDITIONS**

Doriane Aguanno^{1,2}, Garance Coquant¹, Barbara G. Postal^{1,3,4}, Céline Osinski⁵, Margaux Wieckowski^{1,2}, Daniel Stockholm^{1,2}, Jean-Pierre Grill¹, Véronique Carrière¹, Philippe Seksik^{1,6}, Sophie Thenet^{1,2}

¹ Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, INSERM UMRS 938, Paris, France, ² EPHE, PSL University, Paris, France, ³ Université de Paris, Centre de Recherche sur l'Inflammation, INSERM UMR1149, Paris, France, ⁴ Biology and Genetics of Bacterial Cell Wall Unit, Pasteur Institute, Paris, France ⁵ Sorbonne Université, INSERM UMRS 1166, Nutriomics Team, Paris, France, ⁶ Département de Gastroentérologie et Nutrition, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

ABSTRACT

The intestine is home to the largest microbiota community of the human body and strictly regulates its barrier function. Tight junctions (TJ) are major actors of the intestinal barrier, which is impaired in inflammatory bowel disease (IBD), along with an unbalanced microbiota composition. With the aim to identify new actors involved in host-microbiota interplay in IBD, we studied N-acyl homoserine lactones (AHL), molecules of the bacterial *quorum sensing*, which also impact the host. We previously identified in the gut a new and prominent AHL, 3-oxo-C12:2, which is lost in IBD. We investigated how 3-oxo-C12:2 impacts the intestinal barrier function, in comparison to 3-oxo-C12, a structurally close AHL produced by the opportunistic pathogen *P. aeruginosa*. Using Caco-2/TC7 cells as a model of polarized enterocytes, we compared the effects on paracellular permeability and TJ integrity of these two AHL, separately or combined with pro-inflammatory cytokines Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α , known to disrupt the barrier function during IBD. While 3-oxo-C12 increased paracellular permeability and decreased occludin and tricellulin signal at bicellular and tricellular TJ respectively, 3-oxo-C12:2 modified neither permeability nor TJ integrity. Whereas 3-oxo-C12 potentiated the hyperpermeability induced by cytokines, 3-oxo-C12:2 attenuated their deleterious effects on occludin and tricellulin, and maintained their interaction with their partner ZO-1. In addition, 3-oxo-C12:2 limited the cytokine-induced ubiquitination of occludin and tricellulin, suggesting that this AHL prevented their endocytosis. In conclusion, the role of 3-oxo-C12:2 in maintaining TJ integrity under inflammatory conditions identifies this new AHL as a potential beneficial actor of host-microbiota interactions in IBD.

Abbreviations:

TJ, tight junctions; AHL, N-acyl homoserine lactones; IFN γ , Interferon- γ ; TNF α , Tumor Necrosis Factor- α ; ZO-1, Zonula Occludens-1; SCFA, short chain fatty acids; IBD, inflammatory bowel disease; CD, Crohn's disease; QS, quorum sensing; FD4, FITC-Dextran 4 kDa; TEER, transepithelial electrical resistance; LDH, lactate dehydrogenase; PLA, Proximity ligation assay; DAPI, 4'-6-diamidino-2-phenylindole; MLCK, Myosin Light Chain Kinase; ROCK, Rho Associated Kinase; MLC2, Myosin Light Chain 2; TAMPs, Tight junction Associated MARVEL Proteins; IQGAP1, IQ-motif-containing GTPase-activating protein; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor

Key words

N-acyl homoserine lactones; N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone; quorum sensing; intestinal barrier; leak pathway; tight junctions; occludin; tricellulin; inflammatory bowel disease; itch

INTRODUCTION

Among the multiple actors involved in the intestinal barrier function, the intestinal epithelium plays a unique role as it physically separates the microbiota residing in the lumen from systemic tissues and limits the permeation of potential pro-inflammatory molecules from the luminal environment to the lamina propria and circulation. The intestinal epithelial barrier is achieved by the cooperation of three cell-cell junctions forming the apical junctional complex, i.e. tight junctions, adherens junctions and desmosomes, which allow epithelial cells to be tightly connected ¹. Tight junctions (TJ) are key actors in the barrier function since they seal the intercellular space and specifically control the paracellular permeability ². TJs are formed by a network of highly regulated multi-protein complexes, in which several classes of transmembrane proteins are connected to a cortical actomyosin belt through a variety of scaffolding and signaling proteins, including the members of *Zonula Occludens* (ZO) proteins (ZO-1, 2, and 3). This cytosolic plaque is crucial for TJ stability and dynamics ^{3,4}.

TJ permeability to water, ions, small or macromolecules is controlled by different families of transmembrane proteins and is modulated by numerous physiological and environmental factors. A large repertoire of claudins selectively regulates anion and cation passage, in a high capacity but highly-selective "pore pathway" ⁵. Besides, a "leak pathway", corresponding to the permeation of macromolecules, is restricted by occludin at bicellular TJs ⁶ and by tricellulin at tricellular TJs ⁷. Contrary to the pore pathway, the passage of molecules via the leak pathway is very limited in physiological conditions ⁵.

The integrity of the intestinal barrier is compromised in a variety of clinical conditions, including gastro-intestinal disorders (i.e. inflammatory bowel disease, celiac disease, irritable bowel syndrome, infectious diarrheas) and extra-digestive pathologies such as type I diabetes, obesity, liver steatosis and AIDS ⁸. Impairments of both pore and leak pathways have been described in these diseases and the increased passage of macromolecules such as bacterial products from the commensal microbiota is thought to be particularly harmful since it may trigger an excessive activation of the mucosal immune system, which in turn further exacerbates the epithelial barrier failure ⁴. In inflammatory bowel disease (IBD), although intestinal barrier dysfunction is potentially both a cause and a consequence, several data argue for its early implication in the pathogenesis. An increased intestinal permeability was highlighted in healthy first-degree relatives of Crohn's disease (CD) patients ^{9, 10} and was shown to predict disease relapse ^{9, 11}. Linked with these permeability modifications, alterations of several TJ proteins, including increase in expression of the pore-forming claudin-2 ^{12, 13} and decrease in several barrier-forming claudins ¹², as well as decreased levels of JAM-A ¹⁴, occludin ^{12, 15} and tricellulin ^{10, 13} have been reported in the intestinal mucosa of IBD patients. Most alterations were reported in active state of the disease, nonetheless several of them

occurred also in the quiescent state¹⁵ or in healthy relatives¹⁰, highlighting intestinal barrier impairment as a possible early step in the pathogenesis of IBD^{16,17} and the importance of deciphering the mechanisms involved in such defects.

Bacteria-host crosstalk plays a central role in intestinal epithelial homeostasis and is dysregulated in IBD. In recent years, our knowledge of the impact of gut-derived metabolites on the host in the context of IBD has increased considerably. Among the most studied metabolites, are short chain fatty acids (SCFA), bile acids and tryptophan metabolites¹⁸. A yet poorly documented aspect of these microbiota-host interactions is the crosstalk mediated by *quorum sensing* (QS) molecules. QS is a bacterial communication network that relies on the ability of bacteria to monitor and respond to population density *via* diffusible molecules named autoinducers. Different QS systems allow bacterial populations to coordinate gene expression and behavior, and regulate a variety of physiological processes, including virulence factor production and biofilm formation¹⁹. Bacterial QS molecules also exert several effects on eukaryotic cells of the host, in a process named inter-kingdom signaling²⁰.

N-Acyl homoserine lactones (AHL), which mediate auto-induction (AI)-1 type QS, are the most studied QS molecules. QS driven by AHLs has been described in many bacterial ecosystems, but its study in the gastrointestinal tract has long been restricted to pathogens²¹. In a recent study, we demonstrated for the first time the presence of 14 different AHLs in the human gut ecosystem and identified the 3-oxo-C12:2 AHL as the most conserved and abundant one in healthy subjects²². Importantly, 3-oxo-C12:2 AHL levels were reduced in IBD patients, more particularly during flare, and its absence was correlated with dysbiosis²², suggesting a beneficial role of this new molecule in the intestinal ecosystem and protective properties for intestinal mucosa.

This newly described 3-oxo-C12:2 AHL is structurally very close to the widely-studied 3-oxo-C12 AHL. The latter is produced by *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen that is the source of various infections, mostly nosocomial disease and lung infections in cystic fibrosis, and is able to cross epithelial barriers²³. 3-oxo-C12 AHL has been shown to disturb a variety of biological processes in host cells²⁴, among which perturbation of epithelial junctions. In intestinal epithelial cell lines, 3-oxo-C12 AHL induced an increased paracellular permeability to ions and macromolecules^{25,26}, which was accompanied by perturbation of the localization and phosphorylation of the TJ proteins occludin, ZO-1^{26,27}, tricellulin²⁷, JAM-A, ZO-3²⁸, together with the adherens junction proteins E-cadherin and β -catenin²⁶.

In the perspective of using QS molecules as ecological therapeutic approaches for IBD treatment, an in-depth knowledge of their effects on host is an essential step. We therefore focused on the epithelial barrier function, which is compromised during IBD. The aim of the present study was to investigate the putative beneficial role of the newly identified 3-oxo-C12:2

AHL on intestinal epithelial barrier, compared to 3-oxo-C12 AHL, thus unraveling differential effects of these two structurally close AHLs. Focusing on tight junctions as key actors of the barrier function, we addressed in particular whether the AHLs could modulate the effects of pro-inflammatory cytokines Interferon- γ (IFN γ) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF α), known to have deleterious consequences on the intestinal epithelial barrier^{29, 30}. Using Caco-2/TC7 cells as a model of polarized enterocytes, we evaluated the effects of both AHLs, only or combined with IFN γ and TNF α , on paracellular permeability and tight junction integrity. While 3-oxo-C12 AHL disrupted intercellular junctions, increased paracellular permeability and potentiated the effects of IFN γ and TNF α , we showed that 3-oxo-C12:2 AHL protected and stabilized tight junctions, through moderating the increase in occludin and tricellulin ubiquitination induced by cytokines.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatments

We used the TC7 clone of the human intestinal epithelial cell line Caco-2 as a recognized model of well-differentiated enterocytes³¹. Caco-2/TC7 cells were cultured in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium Glutamax (ThermoFisher Scientific) supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (#S1810-500, Eurobio Abcys, Courtaboeuf, France), 1% non-essential amino acids, penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (100 µg/ml) in a 10% CO₂/air atmosphere on semi-permeable filters (24 mm Transwell®, 3 µm pore size; Costar) for 16–18 days to reach optimal differentiated state as described previously³². From confluency (7 days), cells were switched to asymmetric conditions, i.e. with medium containing 20% FCS in the basal compartment and serum-free medium in the apical compartment.

Caco-2/TC7 cells were exposed on their apical side to either N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (150µM, referred as 3-oxo-C12, #O9139, Sigma Aldrich) or 3-oxo-C12:2 homoserine lactone (150µM, referred as 3-oxo-C12:2, synthesized as described in²²) for 48h, in the presence of the lactonase inhibitor 2-hydroxyquinoline (100µM, Sigma-Aldrich). Both AHLs were dissolved in DMSO and then diluted in the apical medium with a final concentration of DMSO as 0,0075% for all conditions including untreated control cells. When indicated Interferon-γ (IFNγ) and Tumor Necrosis Factor-α (TNFα) (50ng/mL, R&D systems) were added in the basal compartment for 48 hours. Media with treatments were daily changed. When specified, Caco-2/TC7 cells were treated with Dynasore (Sigma-Aldrich), which was added to both apical and basal compartments (75µM) on the last 4hours of the experiment.

THP-1 cells were grown at 37°C in a 5% CO₂/air atmosphere in RPMI-1640 (ThermoFisher Scientific) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum and supplemented with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 0.01% β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Prior to co-culture experiments, THP-1 cells were activated with LPS (10ng/mL, #L3024, Sigma-Aldrich) for 18h. THP-1 cells were then harvested and centrifuged, and seeded (10⁶ cells per well) in the basal compartment of Transwell® containing Caco-2/TC7 cells exposed on their apical side to either 3-oxo-C12 or 3-oxo-C12:2 AHL (150µM) or DMSO (total exposure time 48h). Co-cultured was maintained for 24h prior to permeability measurements.

Permeability measurements in Caco-2/TC7 cells

To assess paracellular permeability, FITC-labeled dextran 4 kDa (1mg/mL; TdB Consultancy AB, Uppsala, Sweden) or sulfonic acid 0.4 kDa (0.2mg/mL; ThermoFisher Scientific) were added to the apical medium. Samples of basal medium were collected after 4h, and fluorescence was determined with a microplate fluorometer (FLUOstar Omega; BMG

Labtech). Transepithelial electrical resistance (TEER), which is inversely proportional to permeability to ions, was measured after treatment using a volt-ohm meter (Millipore, Guyancourt, France).

Lactate dehydrogenase release

The release of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) in the apical medium was used to assess treatment cytotoxicity. LDH concentration was measured using the Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Boulogne-Billancourt, France) according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence analysis of junctional proteins

Caco-2/TC7 cells grown on 24 mm Transwell® were fixed and permeabilized with methanol (5 min, -20°C). The following primary antibodies were used: anti-E-cadherin (ECCD2 M108; Takara Bio Europe; 1:1000), anti-occludin (rabbit polyclonal antibody, #71-1500; Thermofisher Scientific; 1:200), anti-tricellulin (rabbit monoclonal antibody, #700191; Thermofisher Scientific; 1:200) and anti-ZO-1 (mouse monoclonal clone 1A12, #339100; Thermofisher Scientific; 1:200). Alexa 488-, Alexa 546- and Alexa 647-conjugated anti-immunoglobulin G were used as secondary antibodies (1:400; Thermofisher Scientific). Nuclei were stained by 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and cells were examined by structured illumination microscopy using an Axio Imager 2 microscope equipped with Apotome.2, allowing optical sectioning (Zeiss, Oberkochen, Germany). Images were acquired by ZEN 2011® software (Zeiss). Quantification of fluorescent labeling was performed by measuring the staining area on thresholded images using Fiji software (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>).

Proximity ligation assay (PLA)

Following fixation and permeabilization in methanol (5 min, -20°C), PLA was performed on cells using two primary antibodies: anti-ZO-1 or anti-ubiquitin (mouse monoclonal clone P4D1 antibody, #BML-PW0930; Enzo; 1:400) or anti-itch (mouse monoclonal clone 32/itch antibody, #611199; BD Transduction Laboratories™; 1:200) combined with either anti-occludin or anti-tricellulin. PLA PLUS and MINUS probes for mouse and rabbit and the Duolink® Orange detection kit reagents (Sigma-Aldrich) were used according to manufacturer's instructions. Nuclei were stained by 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and cells were examined by structured illumination microscopy as described above. Images were acquired by ZEN 2011® software. For Occludin/ZO-1 PLA, the high density and close proximity of spots did not allow to individualize and count PLA spots. Thus the average integrated density of a single PLA spot was estimated over 10 thresholded images per condition for each experiment. This representative value was then used to estimate the number of spots per image. For

occludin/ubiquitin, tricellulin/ubiquitin, occludin/itch or tricellulin/itch PLA assays, spots were well individualized and the number of spots per field was calculated using the 'Analyze Particles' plug-in on thresholded images in Fiji software and was then normalized to respective fluorescence levels (based on area) of either occludin or tricellulin.

Levels of mRNA junctional protein genes by (RT)-qPCR analysis

Total RNA was extracted from Caco-2/TC7 cells using TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. Reverse Transcription (RT) was performed with 1 µg RNA using a high-capacity complementary DNA (cDNA) reverse transcriptase kit (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific). Semi-quantitative real-time PCR was performed with the Mx3000P Stratagene system using SYBR Green (Agilent, Les Ulis, France) according to the manufacturer's procedures. Cyclophilin was used as the reference gene. After amplification, we determined the Ct to obtain $2^{-\Delta\Delta Ct}$ expression values. Human primers sequences were the following:

PPIB (Cyclophilin B) 5'-GCCTTAGCTACAGGAGAGAA-3' (forward) and 5'-TTTCCTCCTGTGCCATCTC-3' (reverse); TJP1 (ZO-1) 5'-CAGAGCCTTCTGATCATTCCA-3' (forward) and 5'-CATCTCTACTCCGGAGACTGC-3' (reverse); OCLN (occludin) 5'-AGGAACCGAGAGCCAGGT-3' (forward) and 5'-GGATGAGCAATGCCCTTTAG-3' (reverse); MARVELD2 (tricellulin) 5'-CAGGCTGTCCTGAGGAAGTT-3' (forward) and 5'-CCGAATGATGTGGCAATCT-3' (reverse).

Determination of tight junction protein levels by Wes™ capillary electrophoresis

Caco-2/TC7 cells were scraped into lysis buffer (20 mM Tris- HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with protease inhibitor cocktail (Complete Mini; Roche, Boulogne-Billancourt, France) and phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP, Sigma-Aldrich). Protein concentrations were determined using the BC Assay (Uptima/Interchim). Wes™ analyses (capillary electrophoresis system; ProteinSimple, San Jose, CA) were performed according to the manufacturer's recommendations, and adequate protein concentrations and antibody dilutions were determined in preliminary assays in order to allow optimal quantitative conditions. The microplates were loaded with 0.8 µg/µL protein (occludin, tricellulin and ZO-1) or 0.2 µg/µL protein (E-cadherin), primary antibodies (as detailed below), and reagents provided by the manufacturer. The same primary antibodies targeting tight junction proteins were used for immunofluorescence and Wes™ analyses: anti-occludin (1:25), anti-tricellulin (1:2000) and anti-ZO-1 (1:200). For E-cadherin detection, the following antibody was used: mouse monoclonal clone 36, #610181; BD Biosciences, Rungis, France (1:1000). Data were analyzed using Compass for SW3.1 software (ProteinSimple). Occludin, tricellulin, ZO-1 levels were

determined by chemiluminescence signal (AUC) and normalized to E-cadherin levels, after verification that E-cadherin levels do not differ between conditions ($p = 0.84$).

Statistical analyses

Data are displayed as means \pm standard error of the mean (SEM) unless otherwise indicated. The number of independent experiments and replicates are indicated in the figure legends. Measurements of permeability (passage of FITC-dextran 4 kDa) and of cytotoxicity (lactate dehydrogenase release) were systemically carried out as internal controls of the treatment's effects for other assays, which explains the larger number of independent experiments performed for these two parameters.

Figures were created with Graphpad® Prism 6.0 (Ritme Informatique, Paris, France). Statistical analyses were performed with Graphpad® Prism 6. The statistical significance of the differences between groups was determined by nonparametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn multiple- comparison post-tests. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Unlike 3-oxo-C12, 3-oxo-C12:2 AHL does not modify paracellular permeability.

We first studied the effects of 3-oxo-C12 or 3-oxo-C12:2 AHLs on paracellular permeability to macromolecules (assessed through the flux of the fluorescent tracer FITC-Dextran 4kDa) and to ions (assessed through the TEER, inversely proportional to the ions flux) in the enterocytic cell line Caco-2/TC7. In accordance with the literature^{25,26}, 3-oxo-C12 AHL induced a 4.8-fold increase in the macromolecular FITC-Dextran 4kDa (FD4) flux (Figure 1A) and a trend towards a 20% decrease in TEER (Figure 1B) compared to untreated control cells. Interestingly, the structurally close 3-oxo-C12:2 AHL modified neither FD4 flux (Figure 1A) nor TEER (Figure 1B). We then investigated whether each AHL could modulate an increase in paracellular permeability induced upon exposure to the two pro-inflammatory cytokines Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α (thereafter referred as IFN γ +TNF α). As expected IFN γ +TNF α induced a 5-fold increase in FD4 passage (Figure 1A) and tended to induce a decrease in TEER (-13%, Figure 1B) compared to control. Strikingly, 3-oxo-C12 AHL potentiated the cytokine effects on both FD4 flux (18-fold increase, Figure 1A) and TEER (41% decrease, Figure 1B), whereas 3-oxo-C12:2 AHL did not modulate the increase in paracellular permeability to macromolecules (Figure 1A) or to ions (Figure 1B). We observed similar effects with the smaller size tracer sulfonic acid (0.4kDa, Supplementary Figure 1A). We then wanted to determine whether the AHLs modulated epithelial cell permeability in the presence of endogenous inflammatory cytokines secreted by immune cells. To this end, Caco-2/TC7 enterocytes exposed to each AHL were co-cultured with activated THP-1 monocytic cells (Figure 1C). While the co-culture of Caco-2/TC7 with THP-1 cells induced a modest increase in paracellular permeability of the epithelial monolayer (1.5-fold increase), the addition of 3-oxo-C12 AHL triggered a 30-fold rise in FD4 flux (Figure 1C). 3-oxo-C12:2 AHL did not modify THP-1 effects on FD4 passage.

Thus, our results confirmed the deleterious role of 3-oxo-C12 AHL on the epithelial barrier function and further demonstrated that it can synergize with another detrimental stimulus such as pro-inflammatory cytokines, whereas 3-oxo-C12:2 remained harmless.

Cell death contributes to intestinal hyperpermeability under inflammatory conditions, generating a TJ-independent unrestricted pathway³³. We assessed cell cytotoxicity through the lactate dehydrogenase (LDH) release in the presence of AHLs, combined with IFN γ +TNF α or in co-culture experiments. The treatment with AHLs alone did not induce significant cytotoxicity in Caco-2/TC7 cells. The increase of LDH release observed in the presence of IFN γ +TNF α alone (2.3-fold, Supplementary Figure 1B) was not further modified when 3-oxo-C12:2 AHL was added. However, in combination with 3-oxo-C12, the increase in LDH release

was slightly greater (3-fold). Interestingly, in Caco-2/TC7-THP-1 co-cultures, the only increase in LDH release was observed upon 3-oxo-C12 treatment (2.3-fold, Supplementary Figure 1C). Taken together, these results showed that the effects of AHLs on permeability were only partially concordant with the cytotoxicity measured in the different conditions. This suggested that cell death was likely to participate in the increase in paracellular permeability in the presence of $\text{IFN}\gamma$ + $\text{TNF}\alpha$, but that other mechanisms concomitantly contributed to the differential effects of the two AHLs on the barrier function.

3-oxo-C12:2 AHL protects tight junctions from $\text{IFN}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ deleterious effects.

Tight junctions (TJ) seal the paracellular space and thus control the flux of molecules or solutes between adjacent cells. We thus investigated whether TJ reorganization accompanied the effects described above on paracellular permeability. Representative images of immunofluorescence staining (Figure 2A), and quantification of the fluorescence (Figure 2B and C), showed that treatment with 3-oxo-C12 AHL alone tended to reduce the signal of both transmembrane proteins occludin (Figure 2A and B, -19% vs control) and tricellulin (Figure 2A and C, -16% vs control) respectively at bicellular or tricellular cell contacts. On the contrary, in the presence of 3-oxo-C12:2, occludin or tricellulin staining remained similar to control (Figure 2A-C).

Upon exposure to $\text{IFN}\gamma$ + $\text{TNF}\alpha$, signals at cell-contacts were significantly decreased compared to control for occludin (Figure 2A and B, -44%) and tricellulin (Figure A and C, -50%), and this effect was maintained to a comparable extent in combination with 3-oxo-C12 (occludin -56% and tricellulin -52%). More importantly, 3-oxo-C12:2 AHL partially prevented the cytokine-induced decrease in fluorescence for occludin (Figure 2A and B, -27% vs. -44% with cytokines only) as well as for tricellulin (Figure 2A and C, -24% vs. -50% with cytokines only).

We then analyzed *Zonula Occludens-1* (ZO-1), which is the main cytoplasmic partner of transmembrane TJ proteins. Interestingly, in the presence of 3-oxo-C12 AHL with or without cytokines, only a slight decrease in ZO-1 staining was observed, which was much less pronounced than for transmembrane TJ proteins (Figure 2A), and modifications between conditions did not reach statistical differences (Figure 2D). ZO-1 staining was maintained in presence of 3-oxo-C12:2 AHL. In addition, the transmembrane protein E-Cadherin, forming adherens junctions, was partially mislocalized (identified as intracellular puncta) in the presence of 3-oxo-C12 AHL or $\text{IFN}\gamma$ + $\text{TNF}\alpha$, individually or in combination (Supplementary Figure 2). Conversely, 3-oxo-C12:2 AHL modified neither E-Cadherin localization nor its fluorescence levels and also protected the protein from the cytokine effects (Supplementary Figure 2).

Collectively, these data confirmed in Caco-2/TC7 intestinal cells previous studies showing impairment of tight junctions by the 3-oxo-C12 AHL alone. We further showed that 3-oxo-C12 did not modulate the deleterious effects of pro-inflammatory cytokines on intercellular junctions, whereas we highlighted for the first time a protective role of 3-oxo-C12:2 AHL, notably on the bicellular TJ protein occludin and tricellular TJ protein tricellulin.

3-oxo-C12:2 AHL maintains TJs protein complexes in presence of cytokines contrary to 3-oxo-C12 AHL.

We then aimed to determine the mechanisms allowing 3-oxo-C12:2 AHL to exert protective effects on TJ integrity. To this end, we first determined whether mRNA levels of genes encoding TJ proteins and/or total protein levels were modified in response to AHLs and cytokines. Our results showed that upon IFN γ +TNF α exposure, mRNA levels of both occludin and tricellulin tended to be decreased (*OCN*, Figure 3A, *MARVELD2*, Figure 3B), as well as their total protein levels (Figure 3D and E, Supplementary Fig 3A). This tendency was maintained in combination with both AHLs without any distinct effects of each molecule compared to cytokines only (Figure 3A-B and D-E). It is worth noting that exposure to 3-oxo-C12:2 alone tended to induce a slight increase in both occludin (Figure 3A, 1.3-fold) and tricellulin (Figure 3B, 1.3-fold) mRNA levels, whereas 3-oxo-C12 AHL did not. In addition, ZO-1 gene mRNA levels (*TJP1*, Figure 3C) and ZO-1 total protein levels (Figure 3E) remained unchanged in all conditions. Similarly, E-Cadherin levels were not modified (Supplementary Figure 3B).

Overall, pro-inflammatory cytokines IFN γ +TNF α tended to downregulate TJ mRNA or protein levels in Caco-2/TC7 cells, in accordance with the data from immunofluorescence analyses (Figure 2). The results showed that 3-oxo-C12:2, which partially prevented the decrease in occludin and tricellulin signal at cell-contacts caused by cytokines (Figure 2), did not modulate their effects on mRNA or total protein levels. We thus hypothesized that protective effects exerted by this AHL could occur through the regulation of TJ stability at cell-cell contacts.

In order to study TJ protein complexes, we used the Duolink proximity ligation assay (PLA) to visualize *in situ* specific endogenous protein-protein interactions. We analyzed interactions between occludin and its cytoplasmic partner ZO-1 on one hand, and between tricellulin and ZO-1 on the other hand.

In untreated Caco-2/TC7 cells, PLA spots of occludin/ZO-1 interaction appeared as fluorescent punctate labeling at bicellular cell-cell contacts (Figure 4A, upper panel) thus recapitulating TJ network. Treatment with 3-oxo-C12 AHL alone led to a decreased number of PLA spots of occludin/ZO-1 compared to control, while 3-oxo-C12:2 AHL did not seem to affect by itself the interaction between these proteins. In the presence of cytokines IFN γ +TNF α , the

density of occludin/ZO-1 PLA spots was diminished and this decrease was maintained in combination with 3-oxo-C12 AHL. The pattern observed when 3-oxo-C12:2 AHL was combined with cytokines was strikingly different since a very intense network of PLA spots delineating cell-cell contacts was maintained. In order to objectify our qualitative observations, we estimated the number of occludin/ZO-1 PLA spots. Although no statistical difference arose due to the difficulty to individualize close PLA spots (See Material & Methods), this estimation revealed a strong trend towards reduced counts of occludin/ZO-1 PLA spots upon exposure to IFN γ +TNF α (-55% vs. control) or in co-treatment with 3-oxo-C12 (-46% vs. control). According to our observations, quantification confirmed the preventing effect of 3-oxo-C12:2 AHL against the cytokine-induced drop of occludin/ZO-1 PLA spots.

Being representative of tricellulin localization pattern, PLA spots of tricellulin/ZO-1 interaction were mostly visualized in untreated cells at tricellular cell-cell contacts and more sporadically at bicellular junctions (Figure 4A, bottom panel). In the presence of 3-oxo-C12 AHL alone, PLA spots of tricellulin/ZO-1 were less dense compared to control, while treatment with 3-oxo-C12:2 did not modify the density or localization of tricellulin/ZO-1 PLA spots (Figure 4A). Interestingly, in response to IFN γ +TNF α only or in association with 3-oxo-C12, the density of tricellulin/ZO-1 PLA spots did not seem changed but their spatial distribution was modified and they appear less organized and more scattered throughout the cells compared to control (Figure 4A, lower panel). By contrast, when 3-oxo-C12:2 AHL was added to cytokine-treated cells, the density and distribution of tricellulin/ZO-1 PLA spots were not affected compared to control, and were completely preserved from disruption triggered by cytokines.

Taken together, these data showed that 3-oxo-C12 AHL disrupted TJ complexes, but without synergistic effects with cytokines. More importantly 3-oxo-C12:2 AHL prevented TJ disruption caused by pro-inflammatory cytokines by maintaining interactions between occludin or tricellulin with their main cytoplasmic partner ZO-1.

3-oxo-C12:2 AHL limits cytokine-induced ubiquitination of occludin and tricellulin.

To go further, we investigated pathways involved in TJ stabilization that could be targeted by 3-oxo-C12:2 AHL and partake in its protective effects against cytokines damage. The two well-characterized pathways mediating TJ disruption in response to pro-inflammatory cytokines IFN γ and TNF α involve an enhanced expression of the Myosin Light Chain Kinase (MLCK)^{29, 33, 34} and Rho-associated Kinase (ROCK), which both lead to higher levels of Myosin Light Chain 2 (MLC2) phosphorylation, actin cytoskeleton reorganization and thus internalization of transmembrane TJ proteins³⁵⁻³⁷. We did not find any modulation of either MLCK total protein levels or phosphorylated MLC2/total MLC2 levels (data not shown), and we thus concluded that these pathways were unlikely to be involved in the protective effects of 3-oxo-C12:2 on TJs in presence of cytokines.

Ubiquitination is the most common post-translational modification and the diversity of ubiquitin motifs (the 'ubiquitin code') allows regulation of a wide range of processes including the fate of a cell surface transmembrane protein such as its endocytosis, recycling and degradation^{38, 39}. Occludin and tricellulin both undergo ubiquitination, which mediates their degradation^{40, 41}. Hence, we postulated that opposite effects of the two AHLs on TJ integrity could involve pathways regulating their stability at the cell membrane such as their ubiquitin-mediated internalization. We thus determined ubiquitination levels of occludin and tricellulin in Caco-2/TC7 cells, using PLA in order to obtain information on the location of ubiquitylated proteins (Figure 5A). In control cells, occludin/ubiquitin or tricellulin/ubiquitin PLA spots, which were scarce, were mostly visualized at cell-cell contacts, which were visualized by E-Cadherin staining (Figure 5A, solid line arrows). In addition, a few intracellular PLA spots (close to the plasma membrane) also appeared in both cases (Figure 5A, dashed line arrows). Thanks to their individualized pattern, occludin/ubiquitin or tricellulin/ubiquitin PLA spots were reliably quantified. The qualitative and quantitative results showed that in the presence of 3-oxo-C12 alone, but not 3-oxo-C12:2, the number PLA spots tended to be increased for occludin/ubiquitin (Figure 5B, 1.8-fold increase vs. control) and tricellulin/ubiquitin (Figure 5C, 1.7-fold increase vs. control). Exposure to IFN γ +TNF α alone led to a 3.2-fold increase in the number of occludin/ubiquitin PLA spots (Figure 5B) and to a 3.5-fold increase in the number of tricellulin/ubiquitin PLA spots (Figure 5C). In co-treatment with 3-oxo-C12, this increase was maintained to a similar extent for tricellulin/ubiquitin PLA spots (Figure 5C), and it was slightly higher for occludin/ubiquitin spots (Figure 5B, 4.2-fold increase vs. control). Most importantly, when Caco-2/TC7 cells were exposed to both IFN γ +TNF α and 3-oxo-C12:2, the increase in the number of occludin/ubiquitin PLA spots was totally suppressed (Figure 5B) and the increase in the number of tricellulin/ubiquitin PLA spots was strongly attenuated (Figure 5C, 2-fold increase vs. control).

To reinforce our data, Caco-2/TC7 cells were treated with 3-oxo-C12:2 or IFN γ +TNF α , individually or in co-treatment with the dynamin inhibitor Dynasore, which blocks endocytosis. We postulated that blocking endocytosis would lead to an accumulation of ubiquitylated occludin or tricellulin at cell-cell contacts. Accordingly, occludin/ubiquitin and tricellulin/ubiquitin PLA spots seemed to be more abundant in control+Dynasore- or in 3-oxo-C12:2+Dynasore-treated cells (Supplementary Figure 4) than observed without the dynamin inhibitor (Figure 5A). In addition, the increasing effects of IFN γ +TNF α on occludin/ubiquitin and tricellulin/ubiquitin PLA spots number were recapitulated in the presence of Dynasore (Supplementary Figure 4). These observations suggested that ubiquitination of either occludin or tricellulin at the plasma membrane occurred prior to their internalization and thus mediates their endocytosis.

As a whole, these data clearly showed that pro-inflammatory cytokines IFN γ and TNF α upregulate ubiquitination of the TJ transmembrane proteins occludin and tricellulin. Our results demonstrated that 3-oxo-C12:2 can abolish or attenuate these deleterious effects of cytokines on occludin and tricellulin, thus supporting our initial hypothesis that this new AHL stabilizes transmembrane TJ proteins at the plasma membrane.

3-oxo-C12:2 AHL restrains the interaction between the ubiquitin-ligase itch and occludin or tricellulin.

Occludin and tricellulin are both targets of the ubiquitin-ligase itch^{40,41}, which is known to ubiquitinate several cell-surface proteins and to mediate their endocytosis⁴². Therefore, we sought to study the interaction between itch and occludin or tricellulin in response to 3-oxo-C12:2 AHL alone and in the presence of cytokines, using PLA since this technique allows to visualize transient interactions. Microscopy images in untreated cells showed scarce occludin/itch PLA spots, localized at the cell membrane (Figure 5D, upper panel). Interestingly, tricellulin/itch PLA spots were more abundant and were also strictly localized at cell-cell contacts (Figure 5D, lower panel). Microscopy analysis and PLA spots quantifications showed that treatment of cells with 3-oxo-C12:2 AHL only did not significantly modify PLA spots pattern for occludin/itch (Figure 5D and E) or tricellulin/itch (Figure 5D and F), although we noticed a trend toward a decrease in their number (respectively -44% and -32% vs. control). Conversely, exposure to IFN γ +TNF α alone tended to increase the number of PLA spots for occludin/itch (Figure 5D and E, 3.4-fold increase vs. control) and tricellulin/itch (Figure 5D and F, 1.9-fold increase vs. control). Concomitant treatment with 3-oxo-C12:2 AHL attenuated the increase in occludin/itch PLA spots observed with cytokines (Figure 5D and E). Furthermore, 3-oxo-C12:2 suppressed the effect of IFN γ +TNF α on tricellulin/itch PLA spots (Figure 5D and F).

Interestingly, no modification of itch localization or itch signal intensity was noticeable in our conditions (data not shown). It is noteworthy that all occludin/itch or tricellulin/itch PLA spots were localized at the cell membrane, including in conditions in which they were more numerous, thus suggesting that the interaction between the ubiquitin-ligase itch and occludin or tricellulin occurred at the plasma membrane and likely prior to internalization of TJ proteins.

DISCUSSION

Acyl-homoserine lactones (AHLs) are the most studied quorum sensing molecules having an impact on host cells, and as such, deserve to be extensively studied in the context of the gut ecosystem. We recently identified an ever described AHL, 3-oxo-C12:2, as the most prominent intestinal AHL²². The present study reveals a protective role of this molecule against tight junction dysregulation under inflammatory conditions, in contrast with the deleterious effects exerted by the structurally close 3-oxo-C12 AHL produced by the opportunist pathogen *P. aeruginosa*.

Whereas several previous studies demonstrated that 3-oxo-C12 AHL disrupts epithelial barriers, in particular through alteration of tight junction proteins²⁵⁻²⁸, our previous study showed no impact of 3-oxo-C12:2 on paracellular permeability to macromolecules in Caco-2/TC7 enterocytic cells²². In the present study, we confirm contrasting effects of the two structurally close molecules, and we further show opposite outcomes when mimicking inflammatory conditions encountered in IBD. In presence of a mixture of two pro-inflammatory cytokines IFN γ and TNF α , known to impair tight junction integrity²⁹, the 3-oxo-C12 AHL from *P. aeruginosa* dramatically amplifies hyperpermeability. It is worth noting that the synergistic effect of 3-oxo-C12 and proinflammatory cytokines occurs on permeability to macromolecules (passage of dextran 4 kDa) and, to a lesser extent, to smaller molecules (passage of dextran 0.4 kDa), but not on permeability to ions (TEER). This is in accordance with the loss of occludin and tricellulin at tight junctions, since these two proteins are known to control the leak pathway^{6,7}. In full opposition, the newly described 3-oxo-C12:2 AHL clearly preserves occludin and tricellulin at tight junctions under inflammatory conditions but paradoxically without improving epithelial permeability to either macromolecules or ions (Figure 6).

In IBD, ulceration and epithelial apoptosis contribute to disruption of the intestinal barrier^{12,43}. In addition to damaging tight junctions, pro-inflammatory cytokines such as TNF α - through activation of their receptor- trigger epithelial cell apoptosis and generate a tight junction-independent unrestricted pathway³³. As expected, given the cytokine treatment we used, a moderate cytotoxicity evaluated by LDH release was observed and was likely to contribute to the increased permeability to macromolecules besides tight junction opening. Remarkably, 3-oxo-C12 or 3-oxo-C12:2 AHLs had very distinctive effects on cytokine-induced unrestricted pathway. We hypothesized that the drastic increase in macromolecules permeability induced by the combination of cytokines and 3-oxo-C12 was due to increased cell death since we showed that tight junctions were not synergistically damaged. Accordingly, 3-oxo-C12 AHL and cytokines both induced apoptosis in the Caco-2/TC7 monolayer and the aggravating effect of 3-oxo-C12 on cytokine-induced hyperpermeability was completely abolished in the presence of a large spectrum caspase inhibitor (data not shown). We thus

concluded that cell death was responsible for the synergistic effects of cytokines and 3-oxo-C12 (Figure 6B), in accordance with studies showing that this AHL induces apoptosis at high concentrations in several cell types⁴⁴⁻⁴⁶. Regarding 3-oxo-C12:2, this AHL did not prevent cytokine-induced hyperpermeability, despite clear protective effects on TJ integrity and stability. Given that this AHL decreased neither cell toxicity nor apoptosis induced by cytokines (not shown), we assume that cell death hid beneficial effects of TJ-protecting 3-oxo-C12:2 AHL on epithelial permeability (Figure 6C).

We focused our study on two tight junction-associated MARVEL proteins (TAMPs) known to control the leak pathway: occludin and tricellulin. Both occludin and tricellulin were diminished at cell-cell junctions in response to IFN γ and TNF α , as expected, whereas the junctional localization of ZO-1 was much less affected. In addition, ZO-1 protein content remained unchanged contrary to the two transmembrane TJ proteins, whose total levels were decreased upon cytokine treatment. These results may be explained by the fact that ZO-1 is a cytoplasmic protein that interacts with many transmembrane junctional proteins, several of which are probably not - or less - affected in our conditions. Despite the apparent lack of perturbation of the whole ZO-1 pool, our PLA experiments showed that molecular complexes involving occludin and ZO-1 were greatly decreased in response to 3-oxo-C12 AHL and/or cytokines. Complexes involving tricellulin and ZO-1 were spatially scattered, suggesting disorganized tricellular TJ. A striking effect of 3-oxo-C12:2 AHL was the conservation of occludin or tricellulin interaction with ZO-1 at the plasma membrane and the correct spatial distribution of these two different complexes, supporting a preserved barrier. While little is known about the functional outcome of tricellulin/ZO-1 complex, the occludin interaction with ZO-1 has been shown to regulate occludin trafficking, localization at the plasma membrane and its barrier function^{47, 48}.

Increased endocytosis is an important mechanism involved in junction disassembly during intestinal inflammation⁴. Internalization of cell-surface proteins - including transmembrane TJ proteins⁴⁹ - involves several pathways leading to either their recycling or degradation. In addition, ubiquitination is a crucial posttranslational modification of transmembrane proteins regulating their endocytosis, trafficking and ultimately their cell surface level^{38, 39}. Phosphorylation of several TJ proteins including occludin⁵⁰ has been associated with their ubiquitination⁵¹. Here, we show that IFN γ and TNF α increased the proportion of ubiquitinated molecular complexes involving occludin and tricellulin. The accumulation of such complexes at the plasma membrane upon endocytosis inhibition supports our hypothesis that ubiquitination of occludin and tricellulin occurs at cell-cell contacts and probably mediates their endocytosis. We further demonstrate for the first time that these cytokines promote interaction at cell-cell contacts of both TAMPs with itch, identifying this E3-ubiquitin ligase as a potential new actor in the signaling pathways involved in junction

disassembly under inflammatory conditions. The 3-oxo-C12:2 AHL can modulate these interactions, and we propose that the down-regulation of itch-mediated occludin and tricellulin ubiquitination stabilizes both proteins together with their molecular partners at the cell membrane, a mechanism that could explain the AHL protective effects on TJ integrity and stability (Figure 6C). Moreover, the protective effects of the 3-oxo-C12:2 AHL are probably not restricted to TJs and are likely to affect other intercellular junctions, as suggested by our observations of E-cadherin localization, a protein well-known to be regulated through its trafficking ⁴. The molecular pathways through which 3-oxo-C12:2 can modulate the ubiquitination process remain to be determined. The identification of eukaryotic AHL interactant proteins is a challenging objective. Among the mammalian interactants of the *P. aeruginosa*-produced 3-oxo-C12 AHL that have been so far identified, are the IQ-motif-containing GTPase-activating protein IQGAP1 ⁵², the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) ⁵³, as well as the bitter receptor T2R38 ⁵⁴. In future studies, the identification of 3-oxo-C12:2 specific eukaryotic targets will allow to further decipher its mechanisms of action, a strategy used in a previous study using biotinylated 3-oxo-C12 ⁵².

We previously demonstrated that 3-oxo-C12:2 AHL is lost in IBD patients, especially during flare ²². Further studies will be needed to integrate all the properties of this new AHL in the context of the gut ecosystem, including its possible impact on the microbiota composition as well as its anti-inflammatory activity ²². Our new findings showing that 3-oxo-C12:2 is able to limit tight junction dismantling in epithelial cells exposed to an inflammatory environment may have therapeutic perspectives in dysfunction of the intestinal barrier in IBD.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Frédéric Barreau for numerous advice, Jean-Pierre Hugot and Maryline Roy for THP-1 cells, Agathe Peyrottes for her help on any chemical troubleshooting and for providing many answers to our questions thanks to her work, Jean-Maurice Mallet for advice and perspectives on the project, Marielle Moreau for support in WES analysis, Céline Prunier for itch antibody and helpful discussions, Sébastien Léon for precious advice about ubiquitination and strategy. This work was supported by funds obtained from Association François Aupetit (AFA) as well as institutional funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Sorbonne Université, and the Ecole Pratique des Hautes Etudes. DA was the recipient of a fellowship from CORDDIM Ile de France.

REFERENCES

1. Laukoetter MG, Bruwer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:85-9.
2. Buckley A, Turner JR. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10.
3. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17:564-80.
4. Lechuga S, Ivanov AI. Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864:1183-1194.
5. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol* 2011;73:283-309.
6. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G1054-64.
7. Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Gunzel D, Westphal JK, et al. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 2009;20:3713-24.
8. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:1075-83.
9. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986;105:883-5.
10. Keita AV, Lindqvist CM, Ost A, Magana CDL, Schoultz I, Halfvarson J. Gut Barrier Dysfunction-A Primary Defect in Twins with Crohn's Disease Predominantly Caused by Genetic Predisposition. *J Crohns Colitis* 2018;12:1200-1209.
11. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993;341:1437-9.
12. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;56:61-72.
13. Krug SM, Bojarski C, Fromm A, Lee IM, Dames P, Richter JF, et al. Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor alpha2, affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis. *Mucosal Immunol* 2018;11:345-356.
14. Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, et al. Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008;135:173-84.
15. Vivinus-Nebot M, Frin-Mathy G, Bziouche H, Dainese R, Bernard G, Anty R, et al. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* 2014;63:744-52.

16. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014;14:329-42.
17. Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;4:33-46.
18. Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020.
19. Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:371-382.
20. Pacheco AR, Sperandio V. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:192-8.
21. Kaper JB, Sperandio V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 2005;73:3197-209.
22. Landman C, Grill JP, Mallet JM, Marteau P, Humbert L, Le Balc'h E, et al. Inter-kingdom effect on epithelial cells of the N-Acyl homoserine lactone 3-oxo-C12:2, a major quorum-sensing molecule from gut microbiota. *PLoS One* 2018;13:e0202587.
23. Golovkine G, Reboud E, Huber P. *Pseudomonas aeruginosa* Takes a Multi-Target Approach to Achieve Junction Breach. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:532.
24. Turkina MV, Vikstrom E. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Innate Immun* 2019;11:263-279.
25. Vikstrom E, Tafazoli F, Magnusson KE. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS Lett* 2006;580:6921-8.
26. Vikstrom E, Bui L, Konradsson P, Magnusson KE. The junctional integrity of epithelial cells is modulated by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms. *Exp Cell Res* 2009;315:313-26.
27. Eum SY, Jaraki D, Bertrand L, Andras IE, Toborek M. Disruption of epithelial barrier by quorum-sensing N-3-(oxododecanoyl)-homoserine lactone is mediated by matrix metalloproteinases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;306:G992-G1001.
28. Vikstrom E, Bui L, Konradsson P, Magnusson K-E. Role of calcium signalling and phosphorylations in disruption of the epithelial junctions by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule. *European Journal of Cell Biology* 2010;89:584-597.
29. Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 2005;166:409-19.
30. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:864-71.
31. Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaux E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, et al. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 1):213-25.

32. Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J, Demignot S. Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* 2005;202:767-76.
33. Su L, Nalle SC, Shen L, Turner ES, Singh G, Breskin LA, et al. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* 2013;145:407-15.
34. Clayburgh DR, Barrett TA, Tang Y, Meddings JB, Van Eldik LJ, Watterson DM, et al. Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *J Clin Invest* 2005;115:2702-15.
35. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Weber CR, Schwarz BT, Austin JR, 2nd, et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol* 2010;189:111-26.
36. Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, et al. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* 2005;16:5040-52.
37. Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J, Anderson JM. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci* 2010;123:2844-52.
38. Foot N, Henshall T, Kumar S. Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins. *Physiol Rev* 2017;97:253-281.
39. Tanno H, Komada M. The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway. *J Biochem* 2013;153:497-504.
40. Jennek S, Mittag S, Reiche J, Westphal JK, Seelk S, Dorfel MJ, et al. Tricellulin is a target of the ubiquitin ligase Itch. *Ann N Y Acad Sci* 2017;1397:157-168.
41. Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F, et al. The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem* 2002;277:10201-8.
42. Piper RC, Dikic I, Lukacs GL. Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6.
43. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:9-21.
44. Taguchi R, Tanaka S, Joe GH, Maseda H, Nomura N, Ohnishi J, et al. Mucin 3 is involved in intestinal epithelial cell apoptosis via N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone-induced suppression of Akt phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;307:C162-8.
45. Tao S, Luo Y, Bin H, Liu J, Qian X, Ni Y, et al. Paraoxonase 2 modulates a proapoptotic function in LS174T cells in response to quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Sci Rep* 2016;6:28778.
46. Neely AM, Zhao G, Schwarzer C, Stivers NS, Whitt AG, Meng S, et al. N-(3-Oxo-acyl)-homoserine lactone induces apoptosis primarily through a mitochondrial pathway in fibroblasts. *Cell Microbiol* 2018;20.
47. Buschmann MM, Shen L, Rajapakse H, Raleigh DR, Wang Y, Wang Y, et al. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell* 2013;24:3056-68.

48. Elias BC, Suzuki T, Seth A, Giorgianni F, Kale G, Shen L, et al. Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions. *J Biol Chem* 2009;284:1559-69.
49. Stamatovic SM, Johnson AM, Sladojevic N, Keep RF, Andjelkovic AV. Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling. *Ann N Y Acad Sci* 2017;1397:54-65.
50. Dorfel MJ, Huber O. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:807356.
51. Murakami T, Felinski EA, Antonetti DA. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem* 2009;284:21036-46.
52. Karlsson T, Turkina Mv Fau - Yakymenko O, Yakymenko O Fau - Magnusson K-E, Magnusson Ke Fau - Vikstrom E, Vikstrom E. The *Pseudomonas aeruginosa* N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration. *PLoS Pathog* 2012.
53. Jahoor A, Patel R, Bryan A, Do C, Krier J, Watters C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors mediate host cell proinflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *J Bacteriol* 2008;190:4408-15.
54. Maurer S, Wabnitz GH, Kahle NA, Stegmaier S, Prior B, Giese T, et al. Tasting *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Human Neutrophils Express the Bitter Receptor T2R38 as Sensor for the Quorum Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Front Immunol* 2015;6:369.



Figure 1: Distinct effects of 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 AHLs on paracellular permeability in Caco-2/TC7 cells in basal or inflammatory conditions. (A) Paracellular permeability to macromolecules assessed by the passage from the apical to the basal side of FITC-Dextran 4kDa (FD4) upon apical exposure to each AHLs (150 μ M, 48h) or basal exposure to IFN γ +TNF α (50ng/mL, 48h). Treatments were performed individually or in combination as indicated. Results are expressed as percentage of the initial quantity of tracer (mean \pm SEM of 3 replicates from 9 independent experiments). (B) Paracellular permeability to ions assessed by the transepithelial electrical resistance (TEER). Treatments were as in (A) (mean \pm SEM of 3 replicates from 2 independent experiments). (C) Paracellular permeability to macromolecules assessed by the passage of FD4 from the apical to the basal side of the Caco-2/TC7 cells treated on their apical side with each AHL (150 μ M, 48h) and co-cultured with activated monocytic THP-1 cells added in the basal compartment for the last 24h of the experiment (mean \pm SEM of 3 replicates from 2 independent experiments). For A, B and C: **P<0.01, ****P<0.0001 vs. control; ##P<0.01, ####P<0.0001 vs. indicated conditions. C12 stands for 3-oxo-C12 and C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

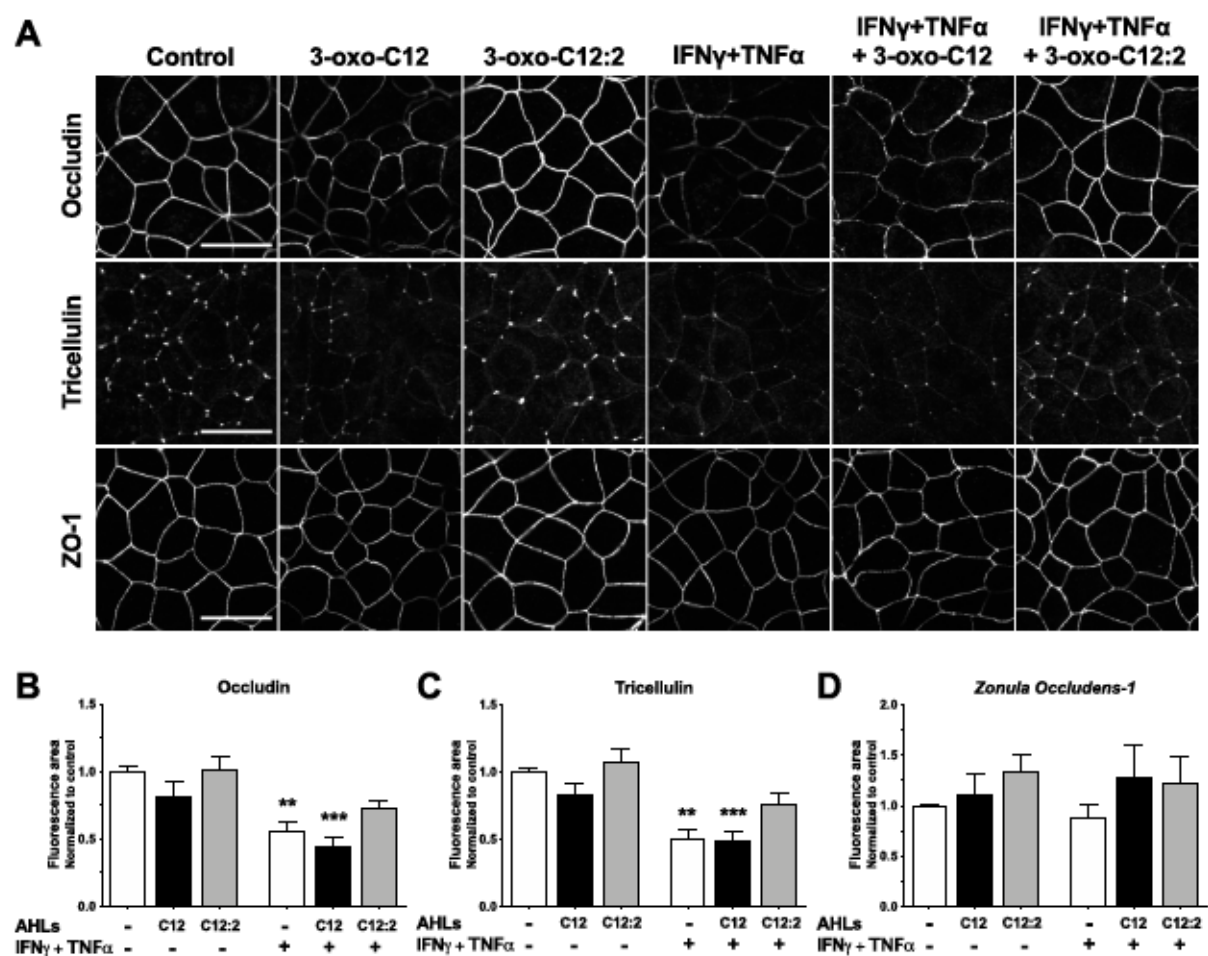


Figure 2: Opposite effects of 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 AHLs on tight junction proteins. (A) Representative fields of structured illumination microscopy images from immunofluorescence of occludin (bicellular contacts), tricellulin (tricellular junctions) and Zonula Occludens-1 (ZO-1) upon apical exposure of Caco-2/TC7 cells to each AHLs (150 μ M, 48h) and/or basal exposure to IFN γ +TNF α (50ng/mL, 48h). Scale bar: 20 μ m. (B, C, D) Quantification of immunofluorescence staining area of occludin (B, mean \pm SEM of duplicates from 5 independent experiments), tricellulin (C, mean \pm SEM of duplicates from 4 independent experiments) and Zonula Occludens-1 (ZO-1) (D, mean \pm SEM of duplicates from 3 independent experiments). For B, C and D: ** P<0.01 and *** P<0.001 vs. control. C12 stands for 3-oxo-C12; C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

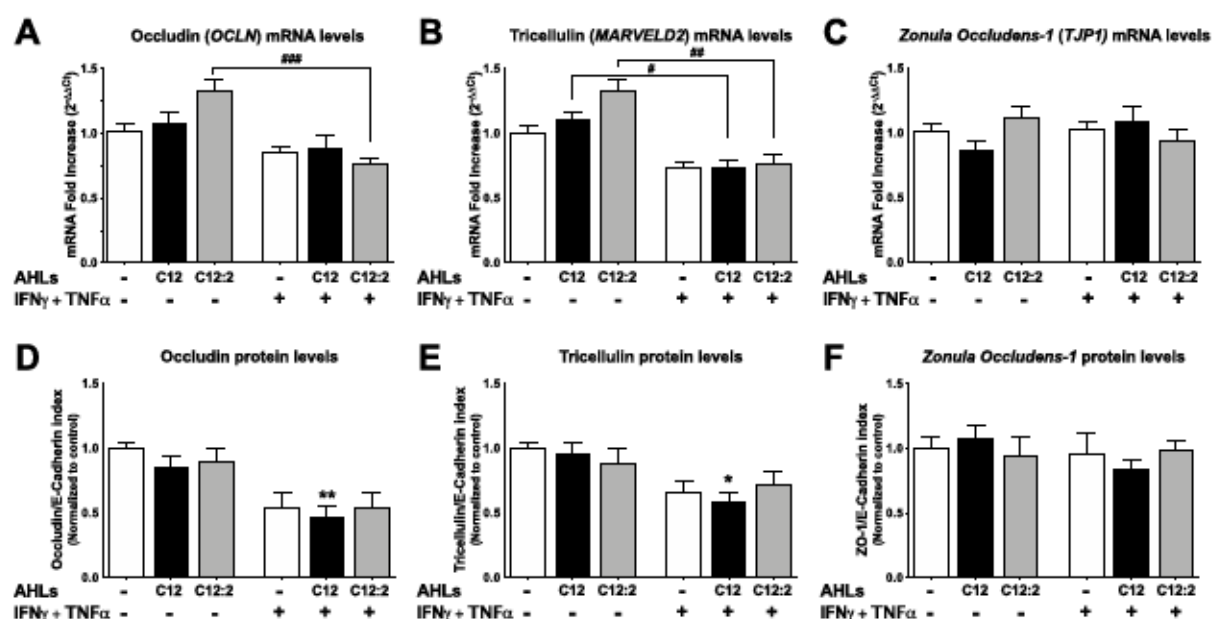


Figure 3: mRNA and total protein levels of occludin, tricellulin and ZO-1 upon exposure to each AHLs in basal or inflammatory conditions. Caco-2/TC7 cells were treated on their apical side by each AHLs (150 μ M, 48h) or on their basal side by IFN γ +TNF α (50ng/mL, 48h). Treatments were performed individually or in combination as indicated. (A, B, C) mRNA levels were determined by (RT)-qPCR for occludin gene (*OCLN*), tricellulin gene (*MARVELD2*) and Zonula Occludens-1 gene (*TJP1*) and normalized to 106yclophilin gene mRNA levels. Results are expressed as ratio values normalized to the control condition (mean \pm SEM of triplicates from 3 independent experiments). (D, E, F) Total protein levels of occludin, tricellulin and Zonula Occludens-1 were quantified by WesTM capillary electrophoresis. Areas under the curve from chemiluminescence results are normalized to respective E-Cadherin levels, which do not differ between conditions (see Supplementary Figure 3B), and expressed as ratio values normalized to the control condition (mean \pm SEM of duplicates from 3 independent experiments). * P<0.05 and ** P<0.01 vs. control; # P<0.05, ## P<0.01 and ### P<0.001 vs. indicated conditions. C12 stands for 3-oxo-C12; C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

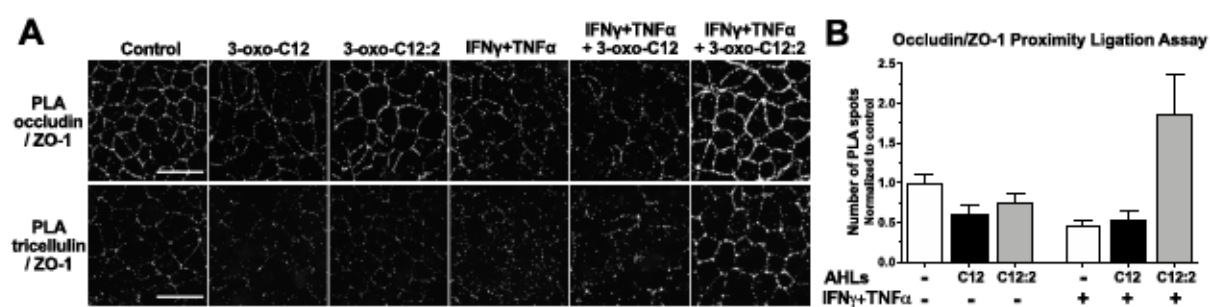


Figure 4: The 3-oxo-C12:2 AHL maintains interaction of occludin and tricellulin with their cytoplasmic partner Zonula Occludens-1 under inflammatory conditions. Caco-2/TC7 cells were treated as in Figures 2 and 3 and interactions between TJ proteins were analyzed by Proximity Ligation Assay (PLA) (A) Representative fields of structured illumination microscopy images from PLA (white spots) between occludin and *Zonula Occludens-1* (ZO-1) (top) or between tricellulin and ZO-1 (bottom). Scale bar: 20 μ m. (B) Quantification of Occludin/ZO-1 PLA spots (mean \pm SEM of 2 or 3 replicates from 3 independent experiments). C12 stands for 3-oxo-C12; C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

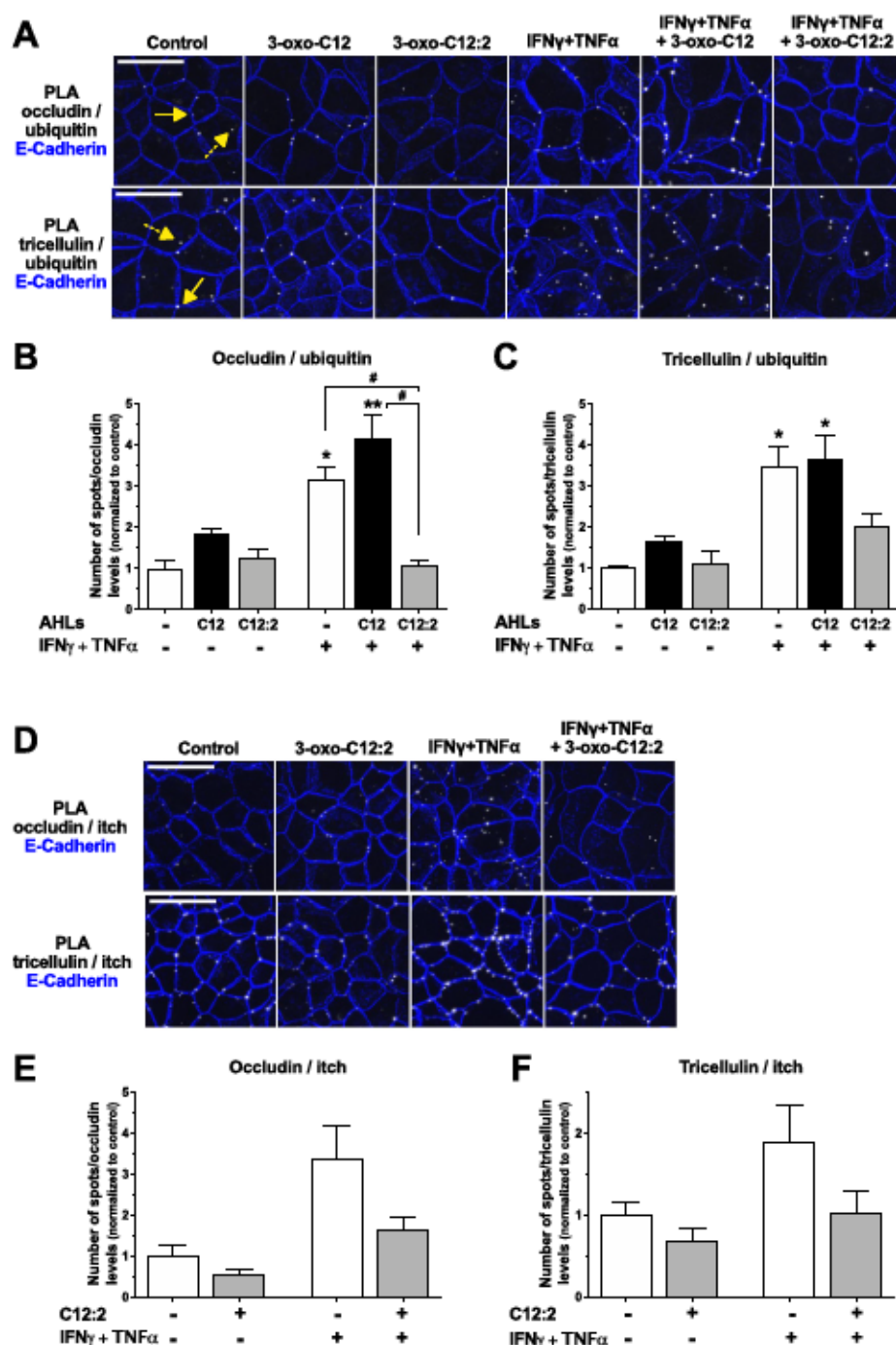


Figure 5: The 3-oxo-C12:2 AHL protects occludin and tricellulin from ubiquitination induced at the plasma membrane in presence of pro-inflammatory cytokines. Caco-2/TC7 cells were treated on their apical side by each AHLs (150 μ M, 48h) or on their basal side by IFN γ +TNF α (50ng/mL, 48h). Treatments were performed individually or in combination as indicated. **(A-C)** Ubiquitination levels of occludin or tricellulin were determined by Proximity Ligation Assay (PLA) **(A)** Representative fields of structured illumination microscopy images of PLA (white spots) between occludin and ubiquitin (top) or between tricellulin and ubiquitin (bottom). Cell-cell contacts are visualized by E-Cadherin immunofluorescence staining in blue. The solid line arrows show PLA spots localized at the plasma membrane while dashed line arrows show PLA spots localized within the intracellular space. Scale bar: 20 μ m. **(B)**

Quantification of the number of occludin/ubiquitin PLA spots normalized to occludin fluorescence levels. Results are expressed as ratio values normalized to the control condition (mean \pm SEM of 2 or 3 replicates from 3 independent experiments). **(C)** Quantification of the number of tricellulin/ubiquitin PLA spots normalized to tricellulin fluorescence levels (mean \pm SEM of 2 or 3 replicates from 3 independent experiments). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. control, # $P < 0.05$ vs. indicated conditions. **(D-F)** Interaction of occludin and tricellulin with the ubiquitin-ligase itch was determined by PLA. **(D)** Representative fields of structured illumination microscopy images from PLA between occludin and itch (top) or between tricellulin and itch (bottom). Cell contacts are visualized by E-Cadherin shown in blue. Scale bar: 20 μ m. **(E, F)** Quantification of the number of occludin/itch or tricellulin/itch PLA spots. Numbers of PLA spots are reported to occludin (E) or tricellulin (F) fluorescence levels and results are expressed as ratio values normalized to the control condition (mean \pm SEM of 2 or 3 replicates from 2 independent experiments). C12 stands for 3-oxo-C12; C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

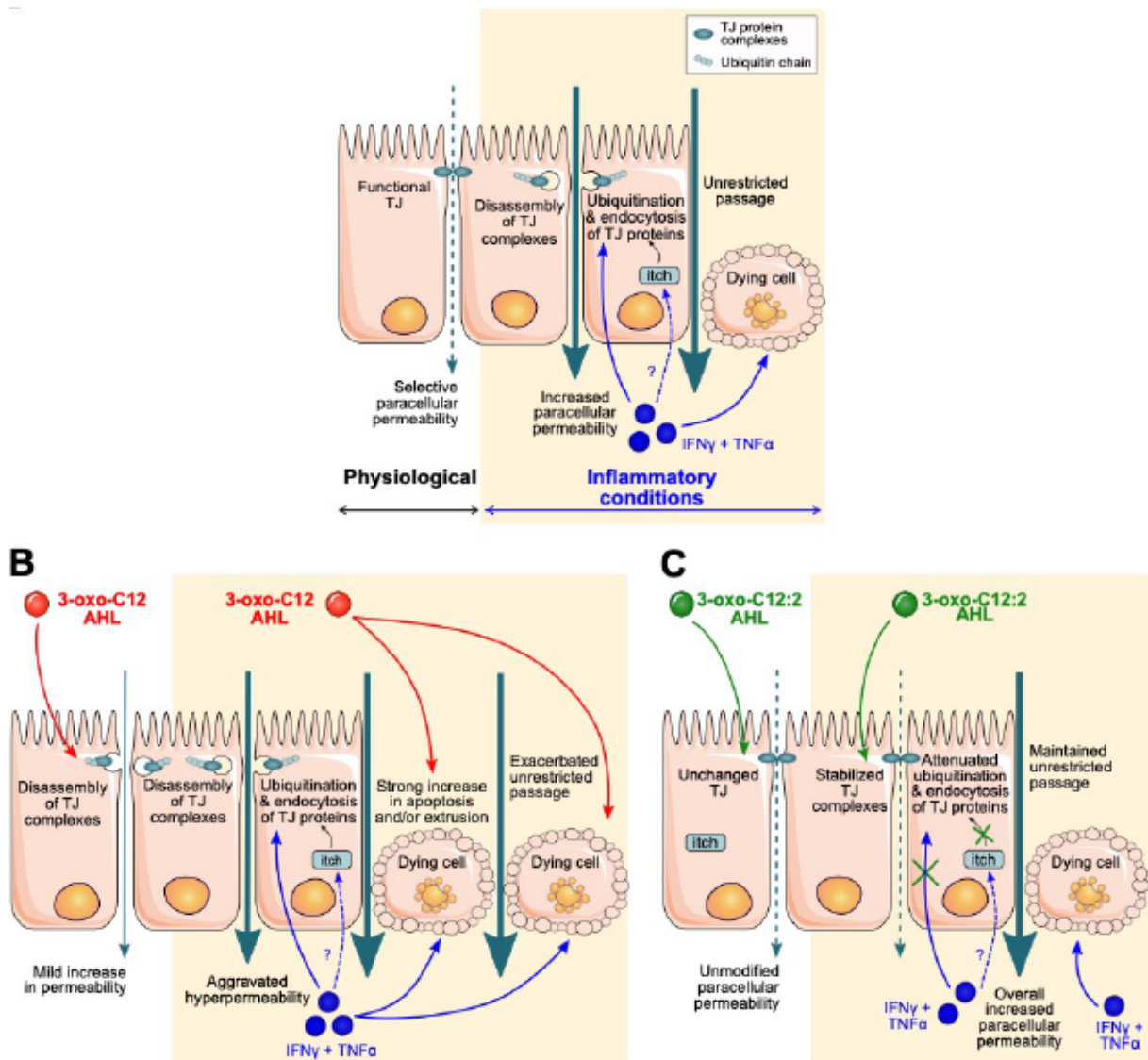
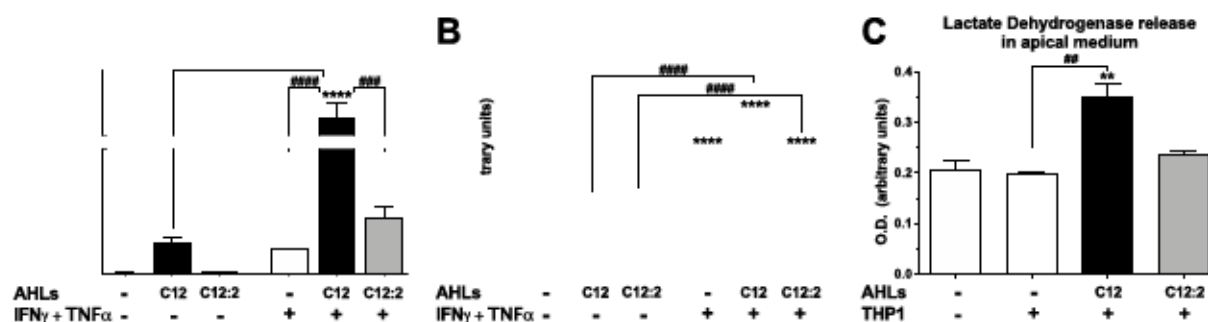
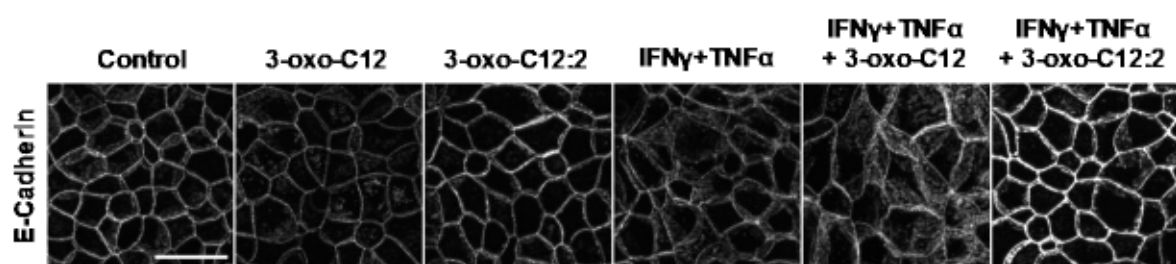


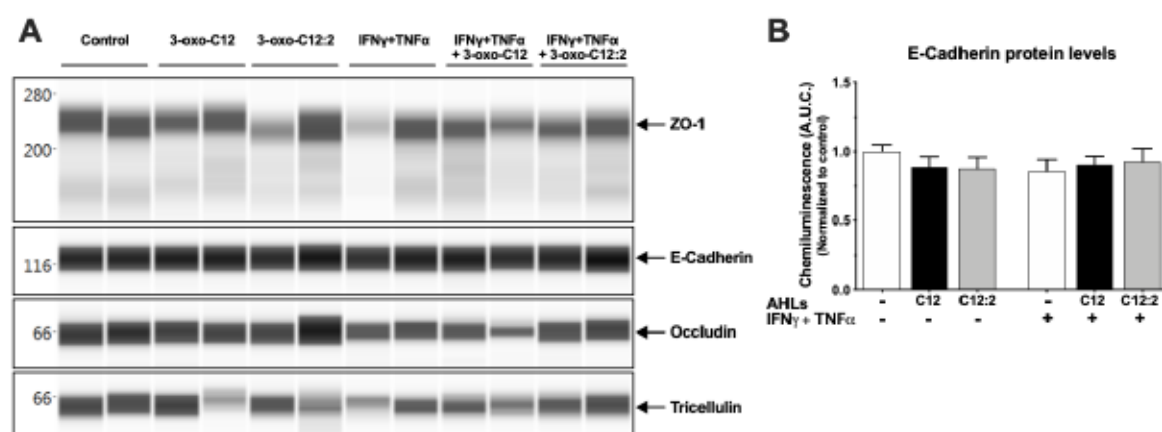
Figure 6: Proposed mechanisms explaining the distinct effects of 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 AHLs on the intestinal epithelial barrier under basal or inflammatory conditions. (A) In physiological conditions (left), tight junctions (TJ) seal the paracellular space between intestinal epithelial cells and control the paracellular permeability in a selective manner. Under inflammatory conditions (right), recapitulated by IFN γ and TNF α exposure, interactions between TJ proteins are destabilized. Pro-inflammatory cytokines induce an increase in the interaction of the E3-ligase *itch* with TJ proteins, which undergo higher ubiquitination and are internalized. These events lead to an increased paracellular permeability. In addition, cytokines induce a moderate rate of cell death, which participates to hyperpermeability through the TJ-independent unrestricted pathway. (B) Exposure to 3-oxo-C12 AHL alone (left) alters TJ integrity, thus inducing a mild increase in permeability. Under inflammatory conditions (right), 3-oxo-C12 AHL does not further impair TJ but aggravates cytokine-induced cell death, hence drastically exacerbating the increase in permeability. (C) Presence of 3-oxo-C12:2 AHL alone (left) does not impair TJ structure and does not modify paracellular permeability. Under inflammatory conditions (right), 3-oxo-C12:2 AHL stabilizes TJ by tempering the dismantling of TJ protein complexes. In addition, while the permeability remains elevated through the unrestricted pathway, this AHL limits the interaction between TJ proteins and *itch* and attenuates the increased ubiquitination of TJ proteins, thus preventing their endocytosis.



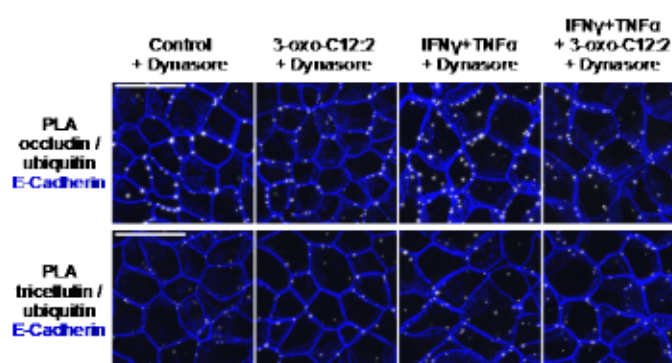
Supplementary Figure 1: Effect of 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 AHLs in basal or inflammatory conditions on paracellular permeability to 0.4 kDa tracer and determination of cytotoxicity. (A) Paracellular permeability to small macromolecules assessed by the passage from the apical to the basal side of FITC-Sulfonic acid 0.4kDa in Caco-2/TC7 cells upon apical exposure to each AHLs (150 μ M, 48h) or basal exposure to IFN γ +TNF α (50ng/mL, 48h). Treatments were performed individually or in combination as indicated. Results are expressed as percentage of the initial quantity of tracer in the apical compartment (mean \pm SEM of 3 replicates from 2 independent experiments). (B) Cytotoxicity assessed by Lactate Dehydrogenase release in the apical medium of Caco-2/TC7 cells treated as in (A) (mean \pm SEM of 3 replicates from 10 independent experiments). (C) Cytotoxicity assessed by Lactate Dehydrogenase release in the apical medium of Caco-2/TC7 cells treated on their apical side with each AHL (150 μ M, 48h) and co-cultured with activated monocytic THP-1 cells added in the basal compartment (mean \pm SEM of 3 replicates from 2 independent experiments). For A, B and C: **P<0.01, ****P<0.0001 vs. control; ##P<0.01, ###P<0.001, ####P<0.0001 vs. indicated conditions. C12 stands for 3-oxo-C12 and C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.



Supplementary Figure 2: Localization of the adherens junction protein E-Cadherin. Representative images of structured illumination microscopy images from immunofluorescence of E-Cadherin in Caco-2/TC7 cells upon apical exposure to each AHLs (150 μ M, 48h) or basal exposure to IFN γ +TNF α (50ng/mL, 48h). Treatments were performed individually or in combination as indicated. Scale bar: 20 μ m.



Supplementary Figure 3: Analysis of junctional proteins by WesTM capillary electrophoresis. Caco-2/TC7 cells were treated as in Figure 3. (A) Representative reconstructed image based on the area under the curve from chemiluminescence signal obtained by WesTM for ZO-1, E-cadherin, occludin and tricellulin. Molecular weight markers (in kDa) are indicated on the left. (B) Total E-cadherin protein levels quantified by WesTM (mean \pm SEM of duplicates from 3 independent experiments). C12 stands for 3-oxo-C12; C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.



Supplementary Figure 4: Ubiquitination levels of occludin or tricellulin in the presence of Dynasore. Caco-2/TC7 cells were treated on their apical side by 3-oxo-C12:2 (150 μ M, 48h) or on their basal side to IFN γ +TNF α (50ng/mL, 48h). Treatments were performed individually or in combination as indicated. Dynasore (75 μ M) was added to both apical and basal sides for the last 4hours of the experiments. Representative fields of structured illumination microscopy images from Proximity Ligation Assay (PLA) between occludin and ubiquitin (top) or between tricellulin and ubiquitin (bottom). Cell contacts are visualized by E-Cadherin immunofluorescence staining in blue. Scale bar: 20 μ m.

B. EFFETS DES AHLs SUR LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE ANALYSES DANS LA
LIGNÉE ENTEROCYTAIRE CACO-2/TC7 : RESULTATS COMPLÉMENTAIRES

i. Comparaison de différentes doses d'AHL

Notre étude réalisée sur la lignée Caco-2/TC7 a permis de confirmer que l'AHL 3-oxo-C12, à haute concentration (150µM) exerce des effets néfastes sur la fonction de barrière épithéliale, en accord avec les résultats de la littérature, tandis que l'AHL 3-oxo-C12:2 protège les jonctions serrées. Comme exposé en introduction (partie III.B, Tableau 6), les effets de l'AHL 3-oxo-C12 varient en fonction de la dose employée. Nous avons donc voulu déterminer si les effets des deux AHLs observés sur la perméabilité paracellulaire et sur l'état des jonctions serrées étaient dose-dépendants dans notre modèle. Pour ce faire, la lignée entérocytaire Caco-2/TC7 a été exposée à des doses croissantes des deux AHLs : 10µM, 50µM et 150µM (dose employée dans les expériences précédentes), seules, ou en combinaison avec les cytokines IFN γ et TNF α (Figure 20). Seul le traitement par l'AHL 3-oxo-C12 à 150µM induit une augmentation du passage du FITC-Dextran 4kDa (FD4) et exacerbe l'effet induit par l'IFN γ +TNF α (Figure 20A). L'exposition à l'AHL 3-oxo-C12:2 seule ne modifie pas le passage du FD4 (Figure 20B), quelle que soit la dose. En combinaison avec les cytokines, l'AHL 3-oxo-C12:2 à la concentration de 10µM tend à légèrement atténuer l'augmentation du passage de FD4 induite par l'IFN γ +TNF α . On peut observer en revanche, à la dose de 150µM, une légère amplification de l'effet des cytokines à 150µM, ce qui contraste avec nos résultats précédents. Ces données sont issues d'une expérience unique et constituent donc des tendances.

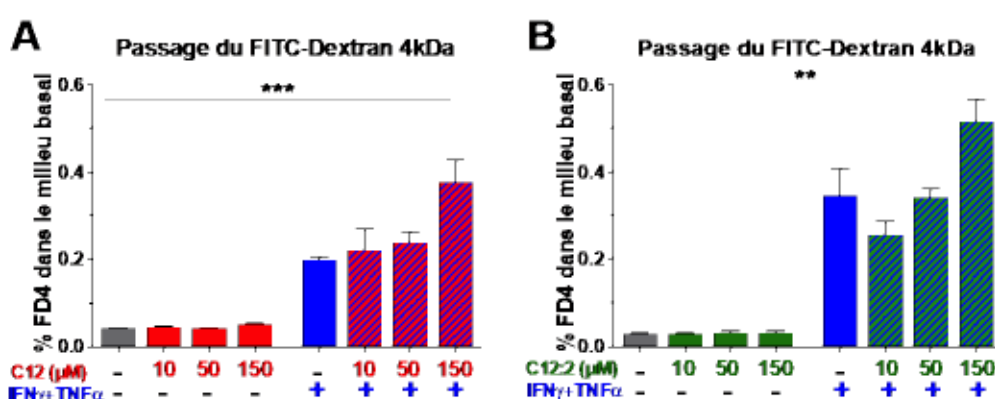


Figure 20 : Perméabilité paracellulaire aux macromolécules mesurée dans la lignée Caco-2/TC7 en réponse à différentes doses d'AHL en situation basale ou inflammatoire.

Les AHLs 3-oxo-C12 (A) ou 3-oxo-C12:2 (B), à 10µM ou 50µM ou 150µM, sont ajoutées dans le compartiment apical (48h), seules ou en combinaison avec les cytokines IFN γ +TNF α administrées dans le compartiment basal (50ng/mL, 48h). Le passage de FITC-Dextran kDa (FD4) au travers de la monocouche est mesuré après 4h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité initiale de traceur passé dans le compartiment basal (moyenne \pm SEM de 3 réplicats sur une expérience unique, test de Kruskal-Wallis sur l'ensemble des conditions).

L'analyse des jonctions serrées par marquages immunofluorescents et quantifications, montre que l'AHL **3-oxo-C12** tend à aggraver l'effet de l'IFN γ +TNF α sur la baisse du signal de l'Occludine à 50 μ M et 150 μ M (Figure 21A) et sur la baisse du signal de la Tricelluline à 50 μ M (Figure 21B). De façon intéressante, l'AHL **3-oxo-C12:2** tend à prévenir la baisse du signal de l'Occludine et de la Tricelluline induite par l'IFN γ +TNF α , à toutes les doses employées (Figure 21C, D). A noter également que nous avons observé des résultats similaires en combinaison avec l'IFN γ +TNF α à des concentrations plus faibles de 10ng/mL (données non montrées).

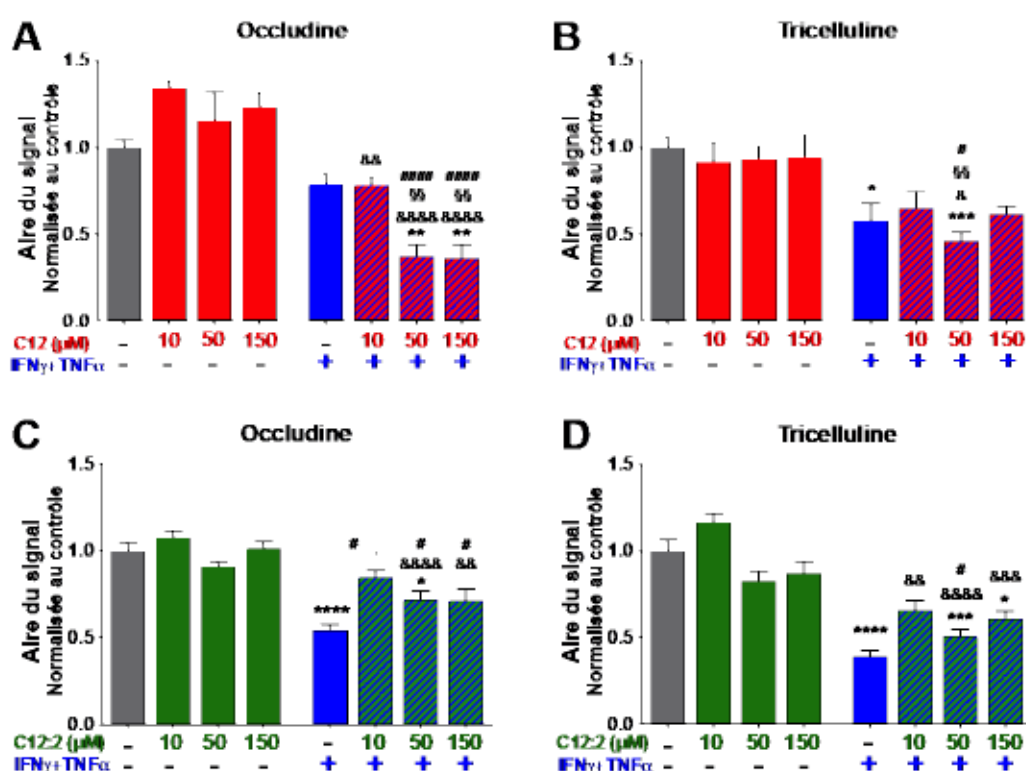


Figure 21 : Analyse des protéines de jonctions serrées dans les cellules Caco-2/TC7 en réponse à différentes doses des AHL **3-oxo-C12** ou **3-oxo-C12:2** en situation basale ou inflammatoire.

Les conditions sont identiques à la Figure 21. Quantification du signal des protéines de jonctions Occludine (A, C) et Tricelluline (B, D) marquées par immunofluorescence (exprimée en unité de surface en pixels normalisé au contrôle); (moyenne \pm SEM, de 7 champs par duplicat sur une expérience unique, test de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; **** P<0.0001 vs. Contrôle; & P<0.05; && P<0.01; &&&& P<0.0001 vs. AHL seule à 10 μ M; ⁵⁵P<0.01 vs. AHL seule à 50 μ M; # P<0.05; ##### P<0.0001 vs. AHL à 150 μ M. En C : #P<0.05 vs. la condition indiquée.

Ces tendances suggèrent donc que l'AHL **3-oxo-C12:2** exerce des effets protecteurs sur les jonctions serrées dès la dose de 10 μ M tandis que les effets délétères de l'AHL **3-oxo-C12** sur l'intégrité des jonctions serrées et la perméabilité paracellulaire sont dose-dépendants.

ii. Études de différents stimuli modulateurs de la fonction de barrière

Nous avons ensuite cherché à déterminer si les effets distincts des deux AHLs pouvaient être reproduits dans des modèles de déstabilisation de la barrière de nature différente des cytokines pro-inflammatoires l'IFN γ et TNF α . Nous avons étudié l'effet du chélateur de calcium EGTA (acide éthylène glycol tétra-acétique) qui est connu pour déstructurer les jonctions intercellulaires et augmenter la perméabilité de la barrière épithéliale (Artursson 1990; Boulenc *et al.* 1993) sans induire d'apoptose. En effet, l'interaction homophile entre les domaines extracellulaires de la E-Cadhérine, ainsi que ceux de la Desmoglérine, est dépendante du calcium et la chélation de ce dernier entraîne l'internalisation de ces protéines transmembranaires (Kartenbeck *et al.* 1991; Meng *et al.* 2009).

L'exposition de la lignée Caco-2/TC7 à l'EGTA (Figure 22A) induit une augmentation du passage du FD4 (d'un facteur 5.5), qui est légèrement exacerbée en association avec l'AHL **3-oxo-C12** (x8 vs. Contrôle). De façon intéressante, lorsque les cellules sont traitées par l'EGTA et l'AHL **3-oxo-C12:2**, l'augmentation de perméabilité au FD4 est amoindrie (x4.6 vs. Contrôle).

Nous nous sommes également intéressés aux effets de l'acide palmitique apporté sous forme de micelles dites post-prandiales, dont la composition reflète celle des micelles lipidiques dans la lumière intestinale après un repas et dont les effets délétères sur la perméabilité paracellulaire et les jonctions serrées ont été démontrés par notre laboratoire (Ghezzal *et al.* 2019).

Le traitement *in vitro* de la lignée Caco-2/TC7 par des micelles postprandiales (MPP) contenant de l'acide palmitique apportées au pôle apical induit une augmentation d'environ 5 fois du passage du FD4 (Figure 22B). A nouveau, l'exposition concomitante avec l'AHL **3-oxo-C12** exacerbe cet effet, alors que l'AHL **3-oxo-C12:2** ne module pas l'augmentation de perméabilité induite par les micelles post-prandiales.

Ces expériences permettent donc de confirmer le rôle délétère de la **3-oxo-C12** sur la barrière épithéliale : cette AHL potentialise les effets de différents stimuli capables d'augmenter la perméabilité épithéliale y compris lorsque ces effets s'exercent dans des temps très courts (4 heures) et en absence de mortalité cellulaire comme dans le cas de l'EGTA. Par ailleurs, ces données montrent que si l'AHL **3-oxo-C12:2** n'atténue pas l'augmentation de perméabilité paracellulaire dans différents modèles d'altération de la barrière, elle peut exercer un effet protecteur modeste contre un stimulus n'induisant pas de mort cellulaire comme l'EGTA.

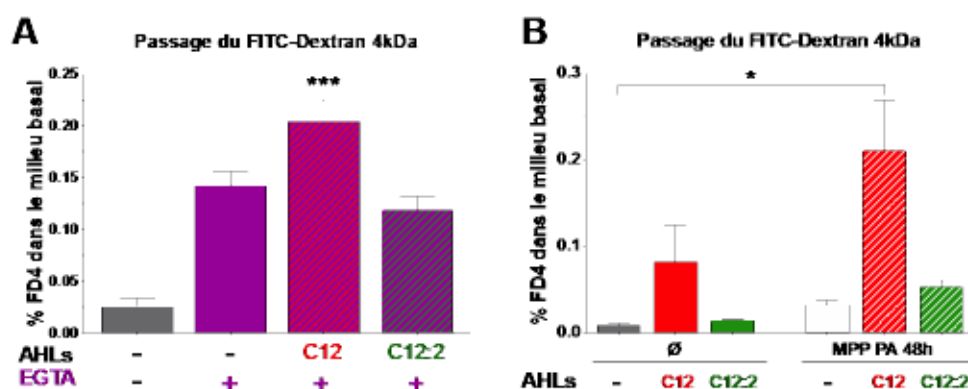


Figure 202 : Impact des AHLs sur différents stimuli déstabilisateurs de la barrière épithéliale dans la lignée Caco-2/TC7. Passage de FITC-Dextran kDa (FD4) au travers de la monocouche mesuré en 4h, en réponse à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 (150µM, 48h) en combinaison avec deux traitements: (A) l'EGTA (5mM) apporté au pôle apical pendant les 4 dernières heures (moyenne ± SEM de 3 réplicats, 2 expériences indépendantes, test de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn, *** P<0.001 vs. Contrôle) ; (B) des micelles postprandiales contenant pour acide gras l'acide palmitique (MPP PA), apportées au pôle apical pendant 48h (moyenne ± SEM de 3 réplicats d'une expérience unique, test de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn, * P<0.05 vs. Contrôle). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité initiale de traceur passé dans le compartiment basal.

iii. Impact de la mort cellulaire et de l'extrusion sur la perméabilité paracellulaire

La mort cellulaire épithéliale peut participer, notamment dans un contexte inflammatoire, à une augmentation de perméabilité *via* le passage non contrôlé de macromolécules (Blander 2018; Buckley *et al.* 2018). Afin de mieux discriminer les effets que nous avons observés sur la perméabilité paracellulaire imputables à la perte cellulaire par apoptose *et/ou* extrusion, nous avons exposé la lignée Caco-2/TC7 à chacune des AHLs, seule ou en combinaison avec les cytokines pro-inflammatoires, en présence d'un inhibiteur de l'apoptose (Z-VAD-FMK, inhibiteur pan-caspase) ou bien de Y-27632, un inhibiteur de la kinase ROCK, nécessaire à l'extrusion des cellules épithéliales. La perméabilité au FD4 a été évaluée, ainsi que la libération de lactate déshydrogénase (LDH). Nous avons analysé le nombre de cellules apoptotiques en marquant la caspase 3 activée comme contrôle de notre traitement inhibiteur de l'apoptose (Figure 23).

Les résultats d'une expérience montrent que les effets de l'AHL 3-oxo-C12, seule, sont atténués, mais pas abolis, lorsque l'apoptose est inhibée, alors qu'aucune modulation n'est observée en présence de l'inhibiteur de ROCK (Figure 23A).

Nous retrouvons l'augmentation de perméabilité induite par les cytokines. En présence d'IFN γ +TNF α et de l'AHL 3-oxo-C12, la perméabilité au FD4 est très fortement augmentée par rapport aux cytokines seules. Cette exacerbation de la perméabilité est fortement atténuée par l'inhibition de l'apoptose mais pas complètement supprimée (Figure 23A). L'inhibition de ROCK atténue une partie des effets synergiques, en proportions moindres que l'inhibition de l'apoptose.

Les résultats obtenus sont similaires en présence de cytokines seules ou en combinaison avec l'AHL 3-oxo-C12:2 : le traitement par le ZVAD (ainsi que celui par le Y-27632 en proportions moindres) atténue l'augmentation du passage de FD4.

On peut noter que l'AHL 3-oxo-C12 ou les cytokines IFN γ +TNF α induisent une augmentation notable du nombre de cellules apoptotiques, et que cette proportion est fortement amplifiée en combinaison des deux traitements (Figure 23C). L'AHL 3-oxo-C12:2 seule induit une légère augmentation de la proportion de cellules apoptotiques, mais de façon plus modérée que l'AHL 3-oxo-C12. On peut constater aussi qu'en présence de 3-oxo-C12:2 l'apoptose est augmentée en combinaison avec les cytokines par rapport aux cytokines seules (Figure 23C).

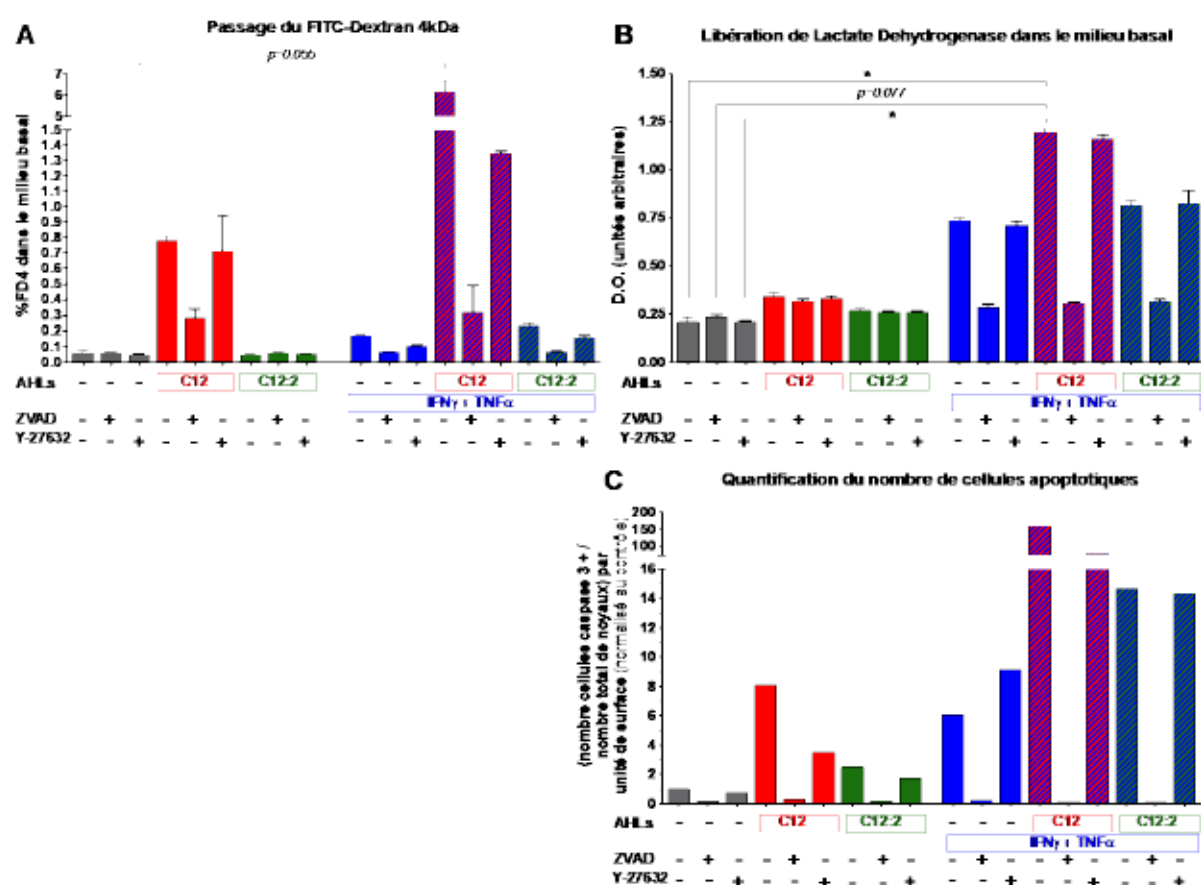


Figure 23 : Effets de l'inhibiteur pan-caspase ZVAD-FMK ou de l'inhibiteur de ROCK Y-27632 sur la réponse aux AHLs 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 en situation basale ou inflammatoire.

Les cellules Caco-2/TC7 ont été traitées comme précédemment pendant 48h avec l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 (150 μ M en apical), seules ou en combinaison avec les cytokines IFN γ +TNF α (50ng/mL en basal). Le ZVAD-FMK (ZVAD, 50mM en apical et basal), ou l'inhibiteur de ROCK, Y-27632 (10mM en apical et basal) ont été ajoutés ou non comme indiqué sur les graphes. (A) Passage de FD4 au travers de la monocouche, mesuré en 4h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité initiale de traceur passé dans le compartiment basal. (B) Libération de Lactate Déshydrogénase dans le milieu apical. Pour (A) et (B) : les résultats présentent la moyenne \pm SEM de 3 réplicats d'une expérience unique. Test de Kruskal-Wallis **** $P < 0.0001$, post-test de Dunn. * $P < 0.05$ vs. Contrôle ; # $P < 0.05$ vs. la condition indiquée. (C) Quantification du nombre de cellules apoptotiques positives au marquage Caspase-3 activée. Après l'immunofluorescence réalisée sur les filtres de cultures, le marquage de la Caspase 3-activée ainsi que le marquage des noyaux au DAPI ont été analysés sur toute la surface *via* un scanner de lames (Zeiss). Les résultats sont exprimés en nombre total de cellules positives sur la surface entière de l'échantillon (total de duplicats correspondant chacun à 1/3^e de filtre de culture) rapportés au nombre total de cellules par condition, et sont présentés ici normalisés au contrôle.

L'ensemble de ces données suggère que la mort cellulaire participe à l'augmentation de perméabilité que l'on observe *in vitro* dans la lignée Caco-2/TC7, et que cette contribution peut expliquer les effets synergiques importants des cytokines pro-inflammatoires et de l'AHL 3-oxo-C12 de *P.aeruginosa*. L'apoptose induite par les cytokines n'étant pas diminuée en présence de 3-oxo-C12:2, elle pourrait masquer l'impact sur la perméabilité des effets bénéfiques de cette AHL naturelle sur les jonctions serrées.

iv. Implication de la voie de régulation des jonctions serrées par la MLCK

Comme mentionné dans l'introduction, la régulation des jonctions intercellulaires par les cytokines IFN γ et TNF α a été décrite dans de nombreuses études et fait intervenir principalement deux voies incluant celle de la MLCK, dont l'expression est augmentée en réponse aux cytokines (Clayburgh *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005). Ceci aboutit à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC), induisant l'internalisation de protéines des jonctions par contraction de la ceinture d'acto-myosine (Marchiando *et al.* 2010; Van Itallie *et al.* 2010).

De façon surprenante, l'analyse du taux d'ARNm du gène codant la MLCK (*MLCK*, Figure 24A) montre que celui est diminué, dans notre modèle de cellules Caco-2/TC7, après 48h d'exposition aux cytokines IFN γ +TNF α , seules (-66% vs. Contrôle) mais également combinées aux AHLs 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 (respectivement -67% et -69% vs. Contrôle). Cette diminution semble être progressive au cours des 48 heures de traitement (Figure 24B). Il est intéressant de noter que le taux d'ARNm de la MLCK tend à être augmenté en présence de l'AHL 3-oxo-C12:2 (Figure 24A). Malgré des taux d'ARNm diminués en présence des cytokines, la quantité totale de la protéine MLCK n'est pas modifiée dans nos conditions (Figure 24C). De plus, nous n'avons pas observé de modification de la quantité de la forme phosphorylée de la MLC (rapportée à la forme totale) dans nos conditions par rapport au contrôle (données non montrées).

Ainsi, ces résultats, contrastant avec les données de la littérature, ne sont pas en faveur d'une augmentation de l'expression de la MLCK en réponse aux cytokines IFN γ et TNF α dans nos conditions. Par ailleurs cette kinase ne semble pas modulée de façon différentielle par les AHLs et ne semble donc pas être un bon candidat pour expliquer leurs effets.



Figure 24 : Expression de la Myosin Light Chain Kinase (MLCK) en réponse aux AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 en situation basale ou inflammatoire.

Les cellules Caco-2/TC7 ont été traitées comme précédemment à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 (150 μ M), seules ou en combinaison avec les cytokines IFN γ +TNF α (50ng/mL). Les taux d'ARNm de l'isoforme longue de la MLCK (*MLCK*) ont été évalués par RT-qPCR (A) après 48h des traitements indiqués (moyenne \pm SEM, de 3 réplicats de 3 expériences indépendantes) ou (B) après 4h, 24h et 48h après le début des traitements indiqués (moyenne \pm SEM, de 3 réplicats d'une expérience unique). (C) Quantité totale de MLCK mesurée par dosage ELISA (CUSABIO, #CSB-E09048h) après 48h des traitements indiqués (moyenne \pm SEM, de 3 réplicats de 3 expériences indépendantes). Test de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn. * P<0.05 ; ** P<0.01 vs. Contrôle ; # P<0.05 ; ## P<0.01 ; #### P<0.0001 vs. la condition indiquée.

v. Expression de cytokines pro-inflammatoires

Comme les cellules du compartiment immunitaire, les cellules épithéliales intestinales sont capables de sécréter des cytokines qui peuvent contribuer à un état inflammatoire et à une altération de la fonction de barrière (Andrews *et al.* 2018). L'AHL 3-oxo-C12 de *P.aeruginosa* exerce, à fortes concentrations (>100 μ M), des effets pro-inflammatoires dans différents modèles, tandis qu'elle semble anti-inflammatoire à des faibles concentrations comme présenté en introduction (Tableau 6, p. 67-68). Nous nous sommes donc demandés si les deux AHLs peuvent moduler de façon différentielle l'expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales intestinales (Figure 25).

Les résultats montrent que l'AHL 3-oxo-C12 à 150 μ M, seule, tend à augmenter les taux d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires Interleukine-8, IL-8 (x2.9 vs. Contrôle, Figure 25A), *Tumor Necrosis Factor- α* , TNF α (x2 vs. Contrôle, Figure 25B) et Interleukine-1 β , IL-1 β (x1.6 vs. Contrôle, Figure 25C). La sécrétion de l'Interleukine-8 est également augmentée (x2 vs contrôle, Figure 25D). L'AHL 3oxo-C12:2 à 150 μ M seule ne modifie ni l'expression ni la sécrétion de ces différentes cytokines. L'exposition aux cytokines IFN γ +TNF α induit également une augmentation des taux d'ARNm de l'IL-8, du TNF α et de l'IL-1 β (respectivement x4.4, x12 et x2.4 vs. contrôle) et de la sécrétion de l'IL-8 (x8 vs. Contrôle). Alors qu'en combinaison avec l'IFN γ +TNF α , l'AHL 3-oxo-C12 amplifie l'augmentation des taux d'ARNm de l'IL-8 (x10 vs. contrôle) et de l'IL-1 β (x3.8 vs. contrôle), l'AHL 3oxo-C12:2 tend à modérer l'augmentation du taux d'ARNm du TNF α causée par cytokines (x7.8 vs.

contrôle, comparé à x12 vs contrôle pour les cytokines seules). Bien que la sécrétion de TNF α ne puisse pas être mesurée dans nos conditions, ces données encouragent l'exploration de modulation de l'expression de cytokines par le compartiment épithélial en réponse aux AHLs.

Ces résultats soulignent à nouveau les effets opposés des deux AHLs sur les cellules épithéliales intestinales et suggèrent que la modulation de sécrétion des cytokines par le compartiment épithélial par l'AHL 3-oxo-C12:2 pourrait contribuer à ses effets protecteurs.

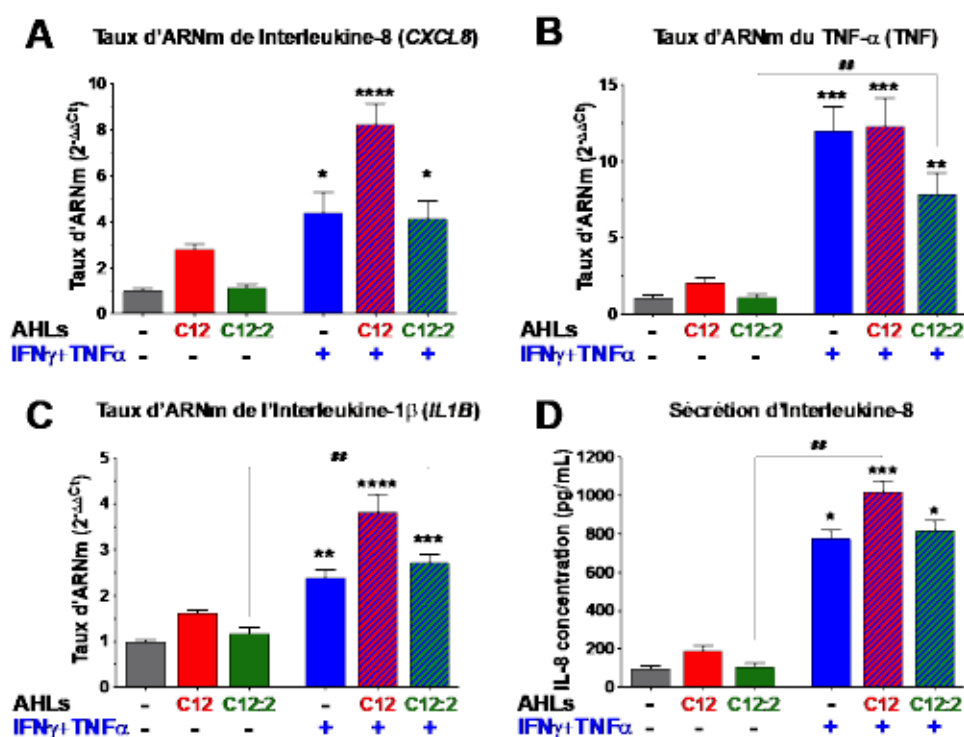


Figure 25 : Expression de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 en situation basale ou inflammatoire.

Les cellules Caco-2/TC7 ont été traitées comme précédemment pendant 48h avec l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 (150 μ M en apical), seules ou en combinaison avec les cytokines IFN γ +TNF α (50ng/mL en basal). Les taux d'ARNm ont été évalués par RT-qPCR pour (A) l'Interleukine-8 (IL-8, CXCL8), (B) le Tumor Necrosis Factor- α (TNF), (C) l'Interleukine-1 β (IL1B) (moyenne \pm SEM, de 3 réplicats de 3 expériences indépendantes). (D) Sécrétion d'IL-8 analysée par dosage ELISA de la concentration d'IL-8 (kit BD Biosciences 555244) dans le surnageant basal (moyenne \pm SEM de 3 réplicats de 3 expériences indépendantes). Test de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; **** P<0.0001 vs. Contrôle; ## P<0.01 vs. la condition indiquée.

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus dans la lignée de cellules épithéliales intestinales Caco-2/TC7 a permis de montrer que les deux AHLs exercent des effets opposés. En effet, alors que l'AHL 3-oxo-C12 altère la barrière épithéliale et potentialise les effets néfastes de cytokines pro-inflammatoires, la nouvelle AHL 3-oxo-C12:2 préserve l'intégrité des jonctions serrées dans ce contexte inflammatoire, suggérant un rôle bénéfique de cette molécule.

C. EFFETS *IN VITRO* DES AHLs SUR LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE DANS UN MODELE D'ORGANOÏDES MURINS

Différentes études *in vitro* montrent un rôle délétère de l'AHL 3-oxo-C12 sur l'apoptose des cellules à mucus (Tao *et al.* 2016; Tao *et al.* 2018) et l'expression ou la sécrétion de mucine des cellules intestinales (Taguchi *et al.* 2014; Tao *et al.* 2016). Ceci suggère qu'en plus de la déstructuration des jonctions serrées, l'AHL de *P. aeruginosa* peut altérer la barrière épithéliale en ciblant d'autres acteurs comme l'intégrité de la monocouche et la couche de mucus.

Nous avons donc voulu comparer les effets des deux AHLs sur l'homéostasie de la barrière épithéliale, de façon plus large, en utilisant le modèle des organoïdes murins, plus proche de la physiologie qu'une lignée cellulaire et qui comprend tous les types de cellules épithéliales intestinales. Les organoïdes sont obtenus après isolation et mise en culture tridimensionnelle des cryptes d'intestin grêle (jéjunum et iléon) de souris, contenant les cellules souches intestinales¹. Des compartiments cryptiques (bourgeons), sont visibles à partir de 3 jours de cultures et les organoïdes atteignent leur taille maximale vers le 5^e jour de culture. Nous nous sommes demandé si les AHLs 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 pouvaient avoir un effet sur le développement et bourgeonnement des organoïdes. De plus, nous avons étudié l'effet, en association avec les AHLs, de la cytokine IFN γ , qui provoque la dégranulation et l'extrusion des cellules de Paneth dans ce modèle (Farin *et al.* 2014).

Plusieurs expériences d'optimisation des concentrations et durées de traitement (non présentées) ont montré que les fortes concentrations d'AHLs (150 μ M), auxquelles les organoïdes ont été exposées dès leur ensemencement à l'état de crypte ouverte, tendent à interrompre rapidement leur développement (suggérant la mort de cellules prolifératives), bien que cet effet diffère en fonction de la souris donneuse et de son âge. Nous avons retenu comme protocole expérimentale 6 jours d'exposition aux AHLs (50 μ M), conditions dans lesquelles le développement des organoïdes ne semblait pas entravé (données non montrées). De plus, le traitement par la cytokine IFN γ peut provoquer la mort cellulaire dans ce modèle à partir de 1ng/mL, comme nous l'avons observé (données non montrées), en accord avec la littérature (Farin *et al.* 2014). Nous avons ainsi combiné les dernières 48h de traitement par les AHLs avec

¹ Pour l'établissement de la culture tridimensionnelle d'organoïdes murins, les cryptes intestinales isolées sont ensemencées dans des plaques 24 puits (300 cryptes par puits) en Matrigel® (à faible teneur en facteurs de croissance, Corning, #356231). Le milieu de culture contient entre autres les facteurs de croissance Epidermal Growth Factor, R-Spondin et Noggin et est renouvelé tous les 2 jours, sauf dans le cas des traitements quotidiens.

celui par l'IFN γ (0.5ng/mL), cette condition de traitement par la cytokine nous permettant d'induire une perturbation modérée de l'homéostasie des cellules épithéliales (observées par le noircissement résultant de l'accumulation de cellules dans la lumière des organoïdes) sans toutefois compromettre leur survie (non montré).

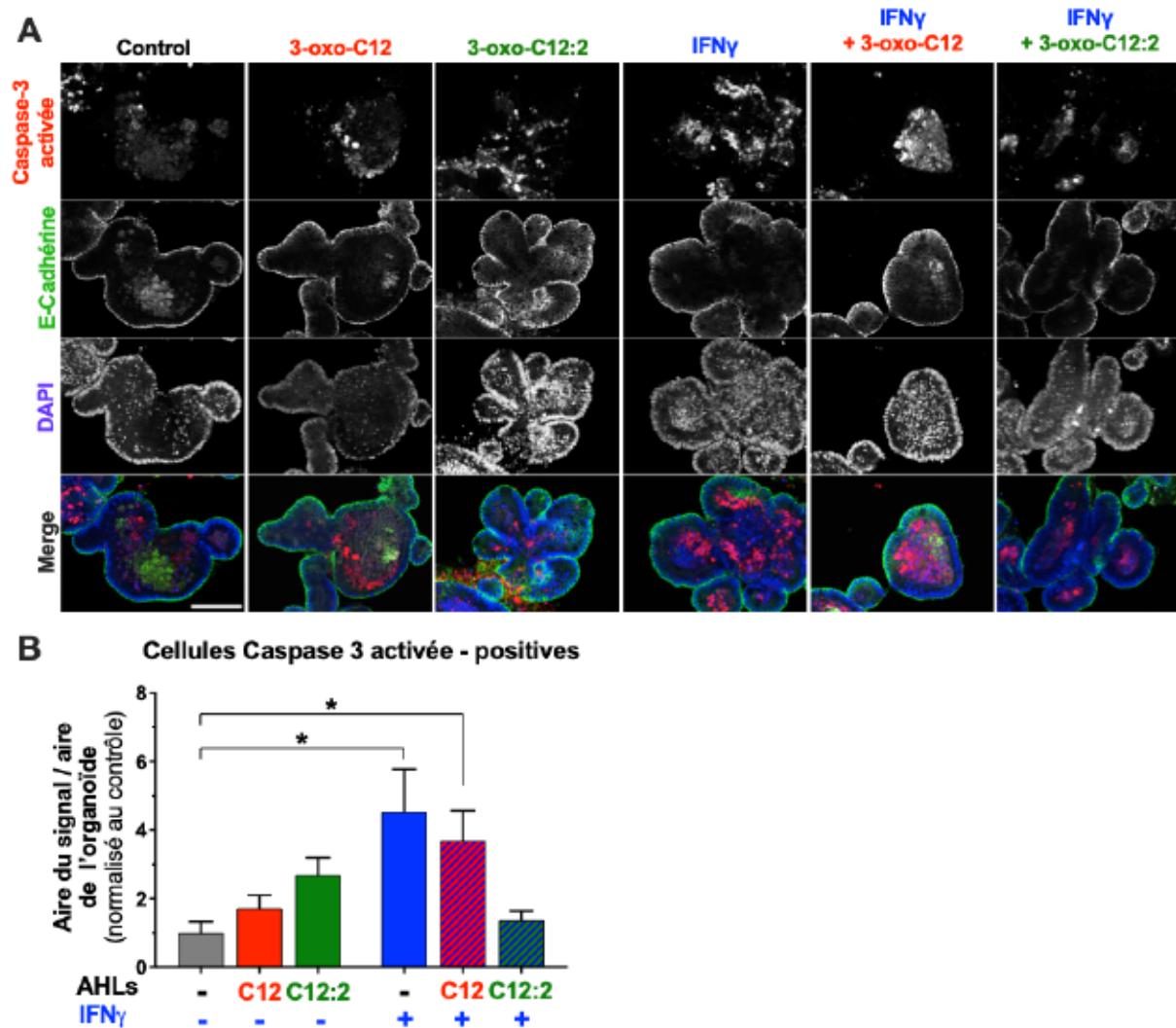


Figure 26 : Analyse de l'apoptose dans les organoïdes intestinaux murins en réponse à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 seule ou en combinaison avec la cytokine IFN γ .

Les AHLs 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2 (50 μ M) ont été ajoutées au milieu de culture dès l'ensemencement des cryptes, afin que le pôle luminal soit exposé avant que les cryptes se referment, puis les traitements ont été renouvelés toutes les 24h pendant 6 jours. La cytokine IFN γ (0.5ng/mL) a été ajoutée les dernières 48h de l'expérience. (A) Images représentatives de marquages en immunofluorescence des cellules apoptotiques (Caspase-3 activée, rouge), des jonctions intercellulaires (E-Cadhérine, vert), des noyaux (DAPI, bleu), et superposition (*merge*). La lumière de l'organoïde, au centre, correspond au pôle luminal tandis que le pôle basal des cellules épithéliales est en contact avec le milieu. La lumière des organoïdes contient des débris cellulaires issus de cellules épithéliales extrudées (ici rendus visibles par le DAPI marquant les fragments nucléaires, apparaissant punctiformes au centre tandis que les noyaux intacts de la monocouche épithéliale sont en bordure). Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope à lumière structurée (Zeiss Axio Imager 2 équipé d'un Apotome). Barre d'échelle 100 μ m. (B) Quantification du signal Caspase-3 activée (mesuré en aire et rapporté à la surface de l'organoïde puis normalisé par rapport au contrôle non traité, moyenne \pm SEM de 7-9 organoïdes d'une expérience unique). Test de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn. * P<0.05.

Les données d'une première expérience nous ont permis d'analyser l'apoptose dans les organoïdes en réponse à chacune des deux AHLs, seules, ou combinées à l'IFN γ (Figure 26). Le marquage et la quantification des cellules positives au marqueur d'apoptose Caspase 3-activée montrent que les deux AHLs, à 50 μ M, tendent à légèrement augmenter la proportion de cellules apoptotiques, sans que ces différences soient significatives (Figure 26A et B). L'exposition à l'IFN γ augmente significativement la proportion de cellules Caspase 3-positives par rapport au contrôle (x4.5 vs. Contrôle) et cet effet est maintenu en combinaison avec l'AHL **3-oxo-C12** (x3.8 vs. Contrôle). En revanche, lorsque l'IFN γ est associée à l'AHL **3-oxo-C12:2**, l'augmentation de la proportion de cellules Caspase 3-positives est atténuée (x1.4 vs. Contrôle).

Nous avons également souhaité analyser la présence de cellules à mucus, autre composante de la barrière épithéliale, dans notre modèle, étant donné que l'AHL **3-oxo-C12** semble modifier l'expression de mucines (Taguchi *et al.* 2014; Tao *et al.* 2016). En raison d'une absence de marquage par immunofluorescence de la mucine-2 satisfaisant, nous n'avons malheureusement pas pu aboutir à une analyse du mucus. De plus, malgré un travail d'optimisation de plusieurs membres de l'équipe, nous n'avons pas réussi à établir une culture en deux dimensions d'une monocouche issue d'organoïdes différenciés murins suffisamment développée pour étudier les effets des AHLs sur la perméabilité paracellulaire.

Au vu des résultats obtenus dans la lignée Caco-2/TC7 sur l'intégrité des jonctions serrées en réponse aux AHLs, nous espérons pouvoir analyser prochainement, par microscopie confocale et quantifications, les marquages de jonctions serrées sur les organoïdes intestinaux.

Enfin, l'analyse, par microscopie confocale et quantification, d'un marqueur de la prolifération (Ki-67) est en cours afin de déterminer si les AHLs peuvent exercer un effet sur l'équilibre prolifération/apoptose, l'homéostasie épithéliale étant perturbée en conditions inflammatoires.

Ces résultats, qui restent à confirmer et compléter, suggèrent que, dans ce modèle d'organoïdes intestinaux murins, l'AHL **3-oxo-C12** ne semble pas moduler les effets cytotoxiques de la cytokine IFN γ tandis que l'AHL **3-oxo-C12:2** pourrait les atténuer.

II. ÉTUDE *IN VIVO* DES EFFETS DES AHLs SUR LA FONCTION DE BARRIÈRE INTESTINALE

Dans un second axe de ce projet, nous nous sommes intéressés aux effets des deux AHLs sur la barrière intestinale *in vivo* chez la souris, afin de prendre en considération l'ensemble des acteurs susceptibles d'agir sur cette fonction. Cette étude a été réalisée dans deux contextes : (i) lors d'expositions de plusieurs semaines aux AHLs, permettant de prendre en compte un éventuel effet sur le microbiote intestinal, et dans le cadre d'une colite inflammatoire chimiquement induite, (ii) lors d'expositions courtes aux AHLs afin de s'affranchir d'une modification de la composition et des propriétés du microbiote.

A. EFFETS DES AHLs A SUR LA FONCTION DE BARRIÈRE INTESTINALE DANS UN MODELE DE COLITE INFLAMMATOIRE CHEZ LA SOURIS

En collaboration avec Florian Chain de l'institut MICALIS (l'Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, de Jouy-en-Josas), nous avons réalisé une série de trois expériences nous permettant de comparer les effets, à moyen terme, des deux AHLs sur la fonction de barrière intestinale *in vivo*, dans un contexte de colite inflammatoire induite au Dextran sulfate de sodium (DSS). Des difficultés d'optimisation des traitements nous ont amenés à modifier les conditions et ne permettent donc pas de présenter les données de façon globale. Les résultats des trois expériences sont donc présentés individuellement.

Les conditions expérimentales d'une première expérience ont été fixées d'après un essai pilote, antérieur à cette étude et visant à étudier la modification de la composition du microbiote intestinal chez la souris après 3 semaines de gavages quotidiens à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2. Les résultats préliminaires de cette étude pilote avaient montré que l'administration de l'AHL 3-oxo-C12 entraînait une augmentation des taux de Bacteroidetes tandis que l'AHL 3-oxo-C12:2 induisait une augmentation dose-dépendante des taux de Firmicutes, phylum bactérien diminué dans la dysbiose associée aux MICI.

Les souris ont donc été gavées quotidiennement avec chacune des AHLs pendant deux semaines avant de recevoir du DSS (2.5%) dans l'eau de boisson pendant 6 jours après lesquels une période de récupération de 4 jours est abordée (Figure 27A). Les effets du DSS se traduisent comme attendu, au bout de plusieurs jours d'exposition, par une perte de poids (Figure 27B) et l'activité de la maladie est quantifiée. Les résultats suggèrent que l'administration de l'AHL 3-oxo-C12:2 tend à réduire la sévérité de la colite (calculée selon l'index d'activité de la maladie, Figure 27C et 27D) et la diminution de la longueur de colon induite par le DSS 2.5% (Figure 27E). Nous n'observons pas de différence de perméabilité *in vivo* au FD4, quelle que soit

l'AHL administrée en combinaison avec une exposition au DSS, par rapport au groupe exposé uniquement au DSS (Figure 26F) et ces résultats sont en cohérence avec le score histologique (évaluant l'altération de la muqueuse du colon et l'infiltrat inflammatoire, données non montrées).

Il est important de noter la sévérité de la colite inflammatoire induite dans cette première expérience : de façon inattendue, une partie des souris du groupe Contrôle+DSS 2.5% est morte, la perte de poids a été importante et aucune reprise de poids n'a été observée pendant la phase de récupération (Figure 27B). Ceci rendait difficile la mise en évidence d'éventuels effets modulateurs des AHLs. Néanmoins, les résultats sur les effets potentiellement bénéfiques de la 3-oxo-C12:2 sur l'activité de la colite nous ont encouragés à poursuivre cette étude.

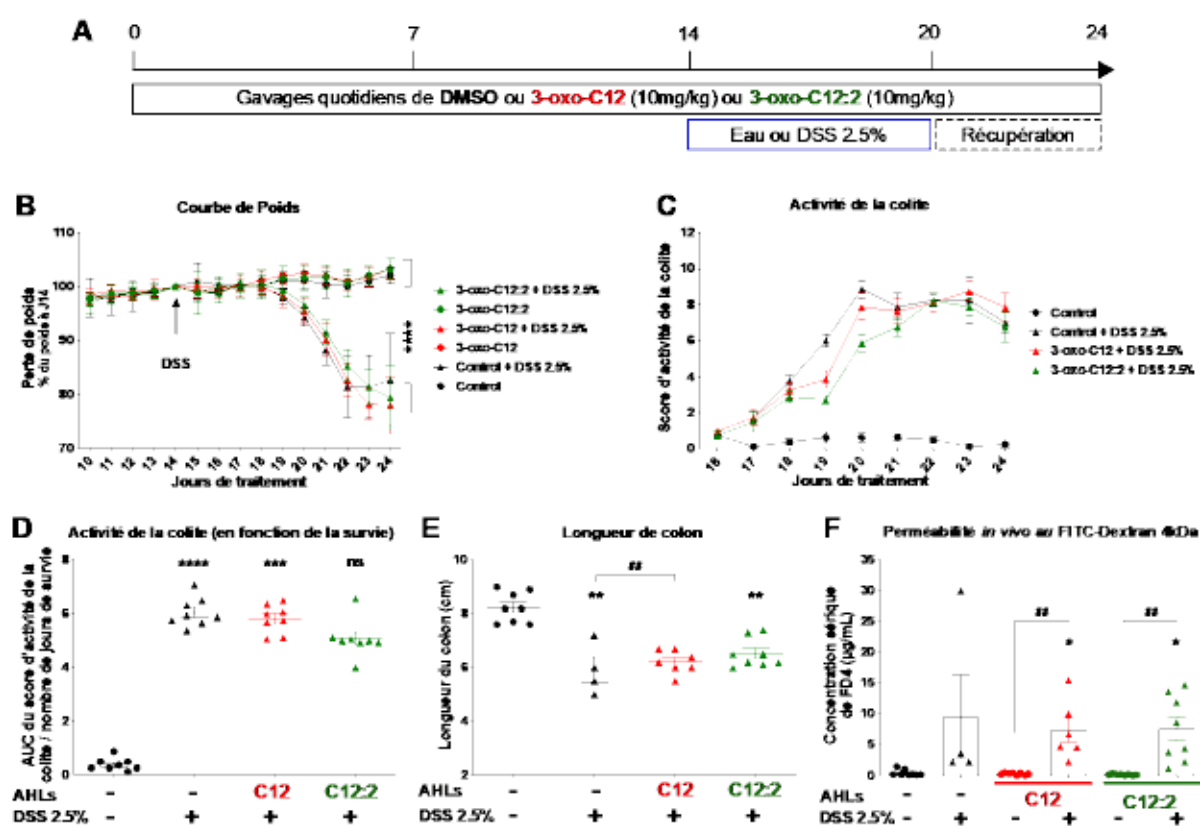


Figure 27 : Colite inflammatoire induite au DSS (2.5%) chez la souris après 24 jours d'exposition à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2. (A) Schéma expérimental. Les AHLs (10mg/kg) ou DMSO (0.1% ; contrôle) ont été administrés par gavages intra-gastriques quotidiens pendant 24 jours. Après un pré-traitement de 14 jours, les animaux ont été soumis ou non à une colite induite par DSS (2.5% dans l'eau de boisson) pendant 6 jours suivis d'une période de récupération. Les animaux ont été observés et pesés quotidiennement. Un score d'activité de la colite (de 0 à 12) a été calculé sur la base du pourcentage de perte de poids, la consistance des selles et la présence de sang dans les selles. Les animaux ont été sacrifiés le 24^e jour, 4h après gavage de FITC-dextran 4kDa. Le sang et le colon ont été prélevés. (B) Évolution du poids et (C) score d'activité de la colite au cours du temps (moyenne \pm SD, n=8 animaux/groupe, exceptée la condition contrôle+DSS pour laquelle n=4 suite à la mort de 4 animaux). Test ANOVA à 2 facteurs, post-test de Tukey. **** P<0.0001 vs. les conditions indiquées. (D) Aire sous la courbe (AUC) du score d'activité de la colite rapportée aux nombres de jours de survie par animal (moyenne \pm SEM, n=8 animaux/groupe). (E) Longueur du colon et (F) perméabilité au FITC-Dextran 4kDa (FD4) mesurée *in vivo* le 24^e jour (moyenne \pm SEM, n=8 animaux/groupe, exceptée la condition contrôle+DSS pour laquelle n=4). Pour (D, E et F) : Test de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn. * P<0.05 ; ** P<0.01 ; *** P<0.001 ; **** P<0.0001 vs. Contrôle ; ## P<0.01 vs. la condition indiquée.

Dans un deuxième essai, nous avons donc réalisé en parallèle deux conditions de traitement au DSS: 2.5% comme précédemment et une dose plus faible de 1.5%, avec l'objectif d'induire une colite moins sévère et de pouvoir étudier les effets éventuellement modulateurs des deux AHLs. Dans ce contexte et afin d'alléger le protocole expérimental, la période de gavages quotidiens aux AHLs a été réduite à 18 jours soit 6 jours de prétraitement d'AHLs avant l'administration du DSS (Figure 28A).

La colite induite par le DSS à 2.5% était, comme dans le 1er essai, plus sévère qu'attendue (avec des pertes de poids supérieure à 20% du poids de certains animaux), ainsi seules les données obtenues dans les conditions DSS à 1.5% sont présentées ici. Ces conditions ont permis d'induire une colite modérée, mise en évidence par une perte de poids légère, inférieure à 10% (Figure 28B), un score histologique de la colite supérieur au contrôle (non montré), et un score d'activité de la colite plus faible qu'en présence de 2.5% de DSS (Figure 28C). Les résultats montrent que le score d'activité de la colite est plus important quand les souris reçoivent l'une ou l'autre des deux AHLs (Figure 28C), contrairement à nos observations du premier essai. Seule la combinaison de gavages par l'AHL 3-oxo-C12 avec la colite au DSS 1.5% diminue significativement la longueur du colon, suggérant un rôle délétère de cette AHL (Figure 28D). La perméabilité intestinale *in vivo* au FD4 tend à être augmentée lors de l'exposition au DSS à 1.5%, et cette augmentation n'est pas modulée par l'une ou l'autre des AHLs (Figure 28E, triangles). A noter que ni l'AHL 3-oxo-C12 ni 3-oxo-C12:2 ne modifient ici la perméabilité intestinale *in vivo* en conditions basales (Figure 28E, ronds). De façon intéressante, l'augmentation, par rapport au contrôle, de la concentration dans le colon de l'enzyme Myéloperoxydase (MPO), marqueur de l'inflammation, qui est induite par la colite au DSS 1.5% est maintenue en combinaison avec l'AHL 3-oxo-C12, mais atténuée lors de l'exposition à l'AHL 3-oxo-C12:2 (Figure 28F).

Cette deuxième expérience nous a donc permis de déterminer une condition de colite modérée (DSS 1.5%). En revanche, ces résultats, notamment ceux concernant les effets potentiellement bénéfiques de l'AHL 3-oxo-C12:2 sur l'activité de la maladie, contrastent avec ceux obtenus précédemment.

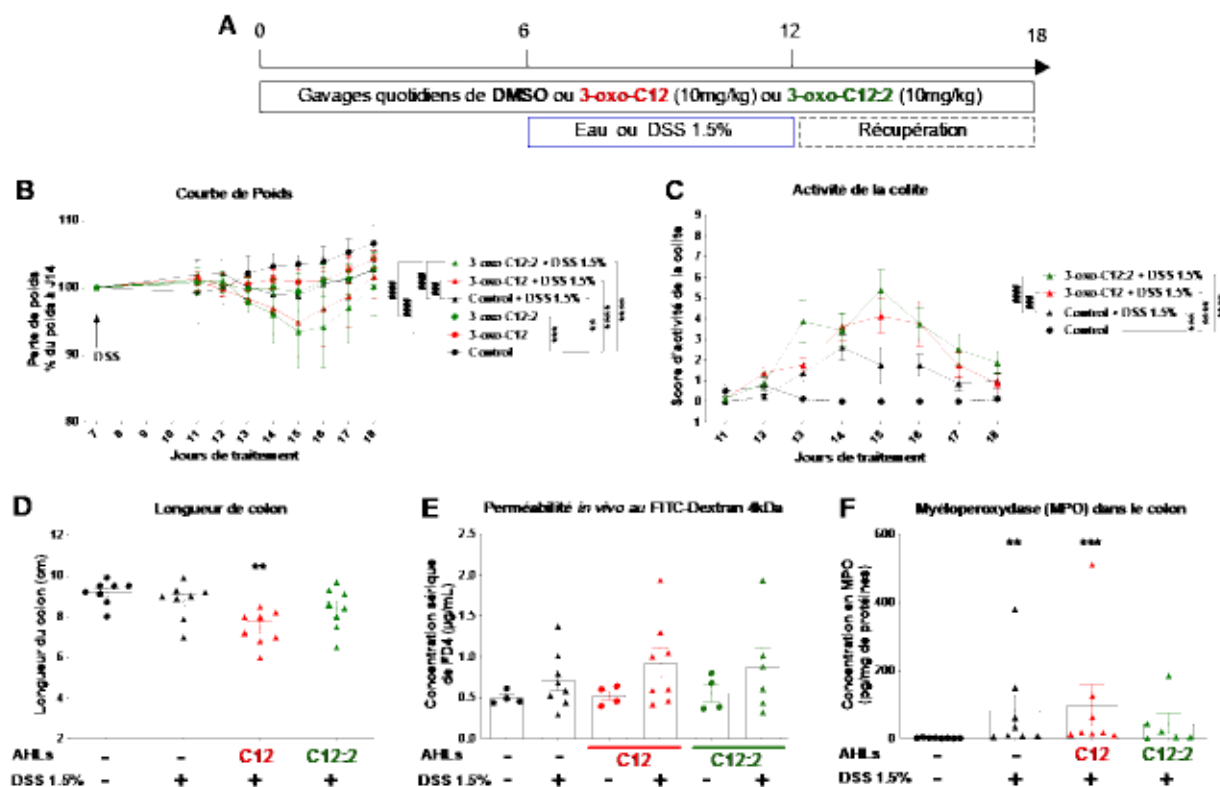


Figure 28 : Colite inflammatoire induite au DSS (1.5%) chez la souris après 18 jours d'exposition à l'AHL **3-oxo-C12** ou **3-oxo-C12:2**. (A) Schéma expérimental. Les AHLs (10mg/kg) ou DMSO (0.1%) ont été administrées par gavages intra-gastriques quotidiens tout au long de l'expérience pendant 18 jours. Les animaux ont été soumis ou non à une colite induite par DSS (1.5 %) après un pré-traitement de 6 jours aux AHLs ou DMSO (contrôle). (B) Évolution du poids et (C) score d'activité de la colite au cours du temps (moyenne \pm SD, $n=8$ animaux/groupe). Test ANOVA à 2 facteurs, post-test de Tukey. ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$ vs. Contrôle; # $P<0.01$; ### $P<0.001$; #### $P<0.0001$ vs. les conditions indiquées. (D) Longueur du colon. (E) perméabilité *in vivo* au FD4 mesurées le 18^e jour. (F) Concentration de la myéloperoxydase (MPO) mesurée par dosage ELISA (HycultBiotech, #HK210) dans des homogénats de colon. Pour (D, E, F) : moyenne \pm SEM, $n=8$ animaux/groupe. Test de Kruskal Wallis, post-test de Dunn. ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ vs. Contrôle.

Dans un troisième et dernier essai, les AHLs ont été administrées pendant un total de 22 jours, pour se rapprocher des conditions de la première expérience, et ce traitement a été associé avec une exposition au DSS 1.5%, permettant d'induire une colite modérée (Figure 29A).

Comme le montrent la perte de poids (Figure 29B) et le score d'activité de la colite (Figure 29C), la colite est plus sévère dans les groupes auxquels l'une ou l'autre des AHLs sont administrées par rapport au groupe Contrôle + DSS, bien que le score histologique soit identique dans les trois groupes (non montré). De même, la tendance à la diminution de la longueur du colon, induite par le traitement DSS, semble légèrement accentuée lors de l'exposition aux AHLs (Figure 29D). En revanche, la concentration du marqueur inflammatoire MPO dans le colon est identique dans tous les groupes exposés au DSS (Figure 29F). La perméabilité intestinale *in vivo* au FD4 (Figure 29E) tend à être augmentée lors de la colite au DSS 1.5% ($\times 2.2$ vs. Contrôle) et cet effet est exacerbée lorsque l'AHL **3-oxo-C12** est

administrée (x5.8 vs. Contrôle), alors que l'exposition à l'AHL 3-oxo-C12:2 ne le module pas. Ces tendances sont similaires aux effets des AHLs sur la perméabilité que nous avons observés dans la lignée Caco-2/TC7.

Certaines différences observées en conditions basales (sans DSS) sont intéressantes à souligner : la longueur du colon tend à être augmentée dans le groupe ayant reçu l'AHL 3-oxo-C12:2 (Figure 29D) et la concentration en MPO dans le colon est significativement diminuée dans le groupe exposée à l'AHL 3-oxo-C12:2 par rapport au groupe contrôle (Figure 29G).

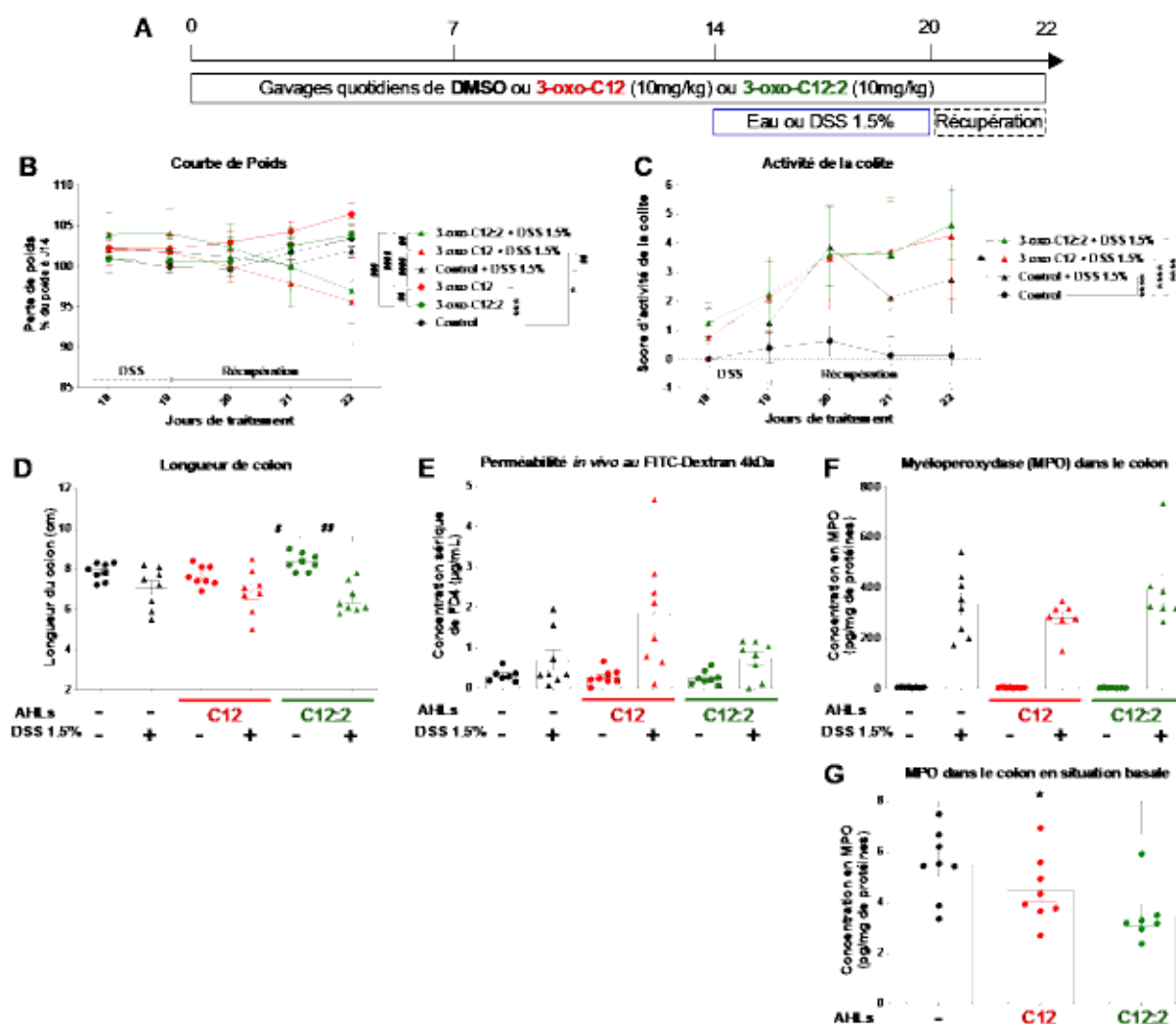


Figure 29 : Colite inflammatoire induite au DSS (1.5%) chez la souris après 22 jours d'exposition à l'AHL 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2. (A) Schéma expérimental. Les AHLs (10mg/kg) ou DMSO (0.1%) ont été administrées par gavages intra-gastriques quotidiens tout au long de l'expérience pendant 22 jours. Les animaux ont été soumis ou non à une colite induite par DSS (1.5%) après un pré-traitement de 14 jours aux AHLs ou DMSO (control). (B) Évolution du poids et (C) score d'activité de la colite au cours du temps (moyenne \pm SD, n=8 animaux/groupe). Pour (B et C) : Test ANOVA à 2 facteurs, post-test de Tukey. * P<0.05 ; ** P<0.01 ; *** P<0.001 ; **** P<0.0001 vs. Contrôle ; # P<0.01 ; ### P<0.001 ; ##### P<0.0001 vs. les conditions indiquées. (D) Longueur du colon. (E) perméabilité *in vivo* au FD4 mesurées le 22^e. (F) Concentration de la myéloperoxydase (MPO) mesurée par dosage ELISA dans des homogénats de colon en réponse aux AHLs lors d'une colite inflammatoire au DSS 1.5%. (G) Concentration de la MPO mesurée par dosage ELISA dans des homogénats de colon en réponse aux AHLs uniquement. Pour (D, E F G) : moyenne \pm SEM, n=8 animaux/groupe. Test de Kruskal Wallis, post-test de Dunn. * P<0.05 vs. Contrôle.

Pour conclure, les difficultés expérimentales inhérentes à ce modèle de colite inflammatoire n'ont pas permis d'obtenir des résultats reproductibles pouvant démontrer de façon claire des effets des AHLs sur la barrière intestinale *in vivo* en situation pathologique.

B. EFFETS A COURT-TERME DES AHLs SUR LA FONCTION DE BARRIÈRE INTESTINALE

En parallèle de notre collaboration avec l'institut MICALIS, nous nous sommes intéressés aux effets des AHLs sur la barrière intestinale chez la souris à court-terme (en l'absence d'éventuelles modifications majeures du microbiote intestinal comme ce pourrait être le cas après plusieurs semaines d'exposition aux AHLs) et en conditions non pathologiques. Suite à nos observations dans les cellules Caco-2/TC7, nous avons souhaité déterminer si nous pouvions mettre en évidence un impact sur la perméabilité intestinale que nous avons mesurée *ex vivo* en chambres de Ussing, permettant d'analyser spécifiquement certains segments intestinaux mais également de pouvoir ajouter *ex vivo* des traitements ou stimuli.

En première approche, nous nous sommes demandés si un traitement court par les AHLs pouvait modifier la perméabilité intestinale dans l'iléon ou le colon. Les AHLs ont été administrées (10mg/kg) par gavages intra-gastriques pendant 2 jours, durée qui correspond à celle des traitements *in vitro* dans la lignée Caco-2/TC7. Comme attendu, la perméabilité mesurée dans le colon est légèrement inférieure à celle de l'iléon. Les résultats de cette expérience montrent qu'aucune des AHLs ne modifie la perméabilité au FD4 mesurée *ex vivo* dans l'iléon (Figure 30A) ou dans le colon (Figure 30B), même si on observe une légère tendance vers une diminution de la perméabilité iléale en présence de l'AHL 3-oxo-C12:2.

Dans un second temps, nous avons cherché à savoir si les AHLs pouvaient moduler une augmentation de perméabilité induite par un stimulus apporté *ex vivo* dans la chambre de Ussing. Des expériences d'optimisation ont mis en évidence que les cytokines IFN γ et TNF α n'induisent pas d'augmentation de perméabilité iléale ou du colon dans ce modèle expérimental dans lequel les tissus ne sont analysés que pendant quelques heures (données non montrées). En revanche, le chélateur de calcium EGTA induit en quelques minutes une ouverture des jonctions intercellulaires et une augmentation de perméabilité épithéliale (Ghezzal *et al.* 2019).

Après avoir confirmé cet effet rapide, nous avons choisi ce stimulus comme 'challenge' *ex vivo*, en combinaison avec chacune des AHLs, administrées en prétraitement chez les souris par voie orale pendant 2 jours puis également ajoutées *ex vivo* dans les chambres de Ussing. Nous nous sommes focalisés sur la perméabilité de l'iléon, segment pour lequel nous avons les résultats les plus satisfaisants dans nos essais d'optimisation. On peut remarquer que la perméabilité iléale au FD4 tend à être légèrement augmentée en présence de **3-oxo-C12**, mais également en présence de **3-oxo-C12:2** (Figure 30C), cette dernière observation étant contradictoire avec nos données *in vitro*. Nos résultats montrent que l'augmentation de perméabilité au FD4 dans l'iléon induite par l'EGTA (x6.3 vs. Contrôle) n'est modifiée par aucune des deux AHLs (Figure 30C).

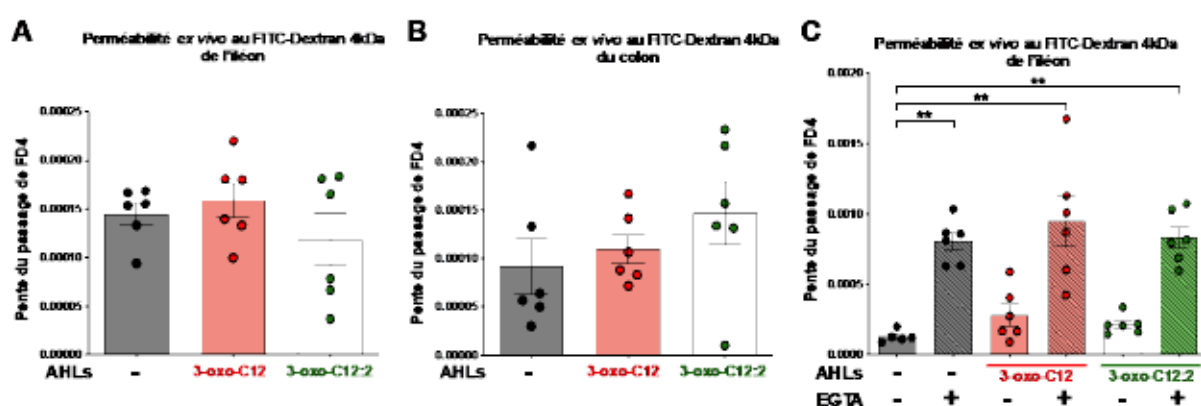


Figure 30 : Perméabilité intestinale mesurée *ex vivo* après 2 jours d'exposition aux AHLs 3-oxo-C12 ou 3-oxo-C12:2. Les souris ont reçu un gavage intragastrique pendant 2 jours consécutifs avec chacune des AHLs (10mg/kg) ou du DMSO (0.075%). (A) Perméabilité de l'iléon ou (B) du colon au FITC-Dextran 4kDa (FD4) mesurée en chambre de Ussing. Les résultats sont exprimés par la pente du passage du FD4 de la chambre luminale vers la chambre séreuse (moyenne \pm SEM, n=6 animaux/groupe). Test de Kruskal Wallis, ns. (C) Perméabilité iléale au FD4 mesurée en chambre de Ussing. Les échantillons ont été ou exposés ou non *ex vivo* au pôle luminal pendant 1h45 au chélateur de calcium EGTA (5mM), en combinaison avec chacune des AHLs (150µM) ou DMSO (0.075%). Les résultats sont exprimés par la pente du passage du FD4 de la chambre luminale vers la chambre séreuse (moyenne \pm SEM, n=6 animaux/groupe). Test de Kruskal Wallis, post-test de Dunn. ** P<0.01 vs. contrôle.

Ainsi, ce modèle expérimental permet de mettre en évidence des effets immédiats sur la perméabilité du tissu intestinal tels que ceux induits sur les jonctions intercellulaires par le chélateur de calcium EGTA mais ne nous a pas permis de confirmer les effets opposés des AHLs **3-oxo-C12** et **3-oxo-C12:2** que nous avons mis en évidence sur des entérocytes en culture.

DISCUSSION &
PERSPECTIVES

Mon projet de thèse avait pour but de déterminer les effets sur la fonction de barrière intestinale d'une nouvelle molécule du *quorum sensing*, l'AHL **3-oxo-C12:2**, récemment mise en évidence dans l'écosystème intestinal humain. Nous les avons comparés à ceux de l'AHL **3-oxo-C12**, dont les effets sur l'hôte avaient déjà fait l'objet de travaux, mais qui n'avait jamais été étudiée dans un contexte mimant l'inflammation et l'altération de la barrière épithéliale dans les MICI.

I. STRATEGIE DE L'ÉTUDE DU RÔLE DES AHLs SUR LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE & MÉCANISMES IMPLIQUÉS

Notre travail a permis de confirmer dans les cellules Caco-2/TC7 le rôle perturbateur de l'AHL **3-oxo-C12** sur la barrière épithéliale (notamment par la déstructuration des jonctions serrées), observé dans plusieurs études (Eum *et al.* 2014; Schwarzer *et al.* 2014; Vikstrom *et al.* 2010; Vikstrom *et al.* 2009; Vikstrom *et al.* 2006). Cette étude a également montré pour la première fois que cette AHL peut exacerber des effets délétères de différents stimuli, dont les cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF α , sur la perméabilité paracellulaire et la mort des cellules épithéliales. Ces résultats sont en accord avec les évidences que la bactérie pathogène opportuniste *P. aeruginosa* profite d'une fragilisation des barrières épithéliales pour infecter l'hôte à l'aide de divers mécanismes (Golovkine *et al.* 2017). À l'inverse, nous avons pu montrer que l'AHL **3-oxo-C12:2** peut contrecarrer l'impact néfaste des cytokines sur l'intégrité des jonctions serrées. Nous avons ainsi mis en évidence dans un modèle *in vitro* de barrière épithéliale d'une part des effets distincts des deux AHLs à l'état basal, et, d'autre part, des effets opposés dans un modèle mimant les conditions inflammatoires des MICI.

Bien que l'AHL de *P. aeruginosa* n'ait pas été détectée dans l'écosystème intestinal humain dans l'étude précédente du laboratoire (Landman *et al.* 2018), l'intérêt d'inclure dans ce projet l'AHL **3-oxo-C12**, en comparaison avec l'AHL **3-oxo-C12:2**, reposait sur la structure identique des deux molécules, à l'exception de deux insaturations. En effet, *P. aeruginosa* n'étant ni une bactérie commensale ni un pathogène spécifiquement intestinal, il n'est pas surprenant de ne pas détecter la **3-oxo-C12** parmi les AHLs les plus représentées dans l'intestin humain. Néanmoins, *P. aeruginosa*, pathogène opportuniste particulièrement présent en milieu hospitalier, est retrouvée dans les selles de sujets sains (Kerckhoffs *et al.* 2011; Estepa *et al.* 2014; Ruiz-Roldan *et al.* 2018) ou chez les sujets hospitalisés comme le suggèrent plusieurs études épidémiologiques (Stoodle *et al.* 1970; Thuong *et al.* 2003; Vuotto *et al.* 2013). Par

ailleurs, bien que *P. aeruginosa* évolue dans des milieux aérobies, il a été montré que la bactérie peut établir des biofilms anaérobies, structures dont la formation est contrôlée par le *quorum sensing* (Yoon *et al.* 2002). De plus, cette bactérie ubiquitaire est responsable de nombreuses infections et il est donc intéressant d'étudier dans un contexte inflammatoire le rôle d'une des molécules du QS participant à sa virulence.

Enfin, l'AHL 3-oxo-C12 est l'une des molécules du *quorum sensing* (QS) les plus étudiées et les mieux décrites et constitue donc une référence indispensable, notamment concernant les mécanismes potentiellement impliqués, dans l'étude de l'AHL structurellement proche 3-oxo-C12:2, pour laquelle très peu de données existent.

Une des questions, qui reste encore ouverte à ce jour, est la source naturelle de la 3-oxo-C12:2, identifiée comme AHL majoritaire dans les selles humaines (Landman *et al.* 2018). Comme présenté en introduction (partie III.C.i), les seules bactéries intestinales connues ayant un système de QS incluant la synthèse et la reconnaissance d'AHLs sont les entéropathogènes *Yersinia enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* (Atkinson *et al.* 1999; Throup *et al.* 1995). La présence de l'AHL 3-oxo-C12:2 dans les échantillons étant associée à une abondance plus importante de bactéries du phylum des Firmicutes, des recherches d'homologues des gènes de synthèse d'AHLs dans les bactéries de ce phylum avaient été effectuées mais n'avaient pas abouti à des résultats probants (Landman *et al.* 2018). En effet, les bactéries capables de synthétiser des AHLs avec une double insaturation sur la chaîne carbonée sont rares et appartiennent surtout au groupe des bactéries marines *Roseobacter* (Ziesche *et al.* 2015). Une étude récente a montré que plusieurs souches du groupe *Roseobacter*, isolées en milieu marin, produisent une AHL à 12 carbones et deux insaturations (3-oxo-C12:2), qui possède une activité QS démontrée dans la souche rapportrice *Pseudomonas putida* (Ziesche *et al.* 2018). Étant donné sa structure rare, l'hypothèse de l'équipe est que l'AHL 3-oxo-C12:2 serait issue d'une chaîne de transformations impliquant plusieurs bactéries. Nous ne disposons pas de bactérie(s) candidate(s) comme productrice(s) de cette AHL. Néanmoins, des systèmes de culture d'un microbiote humain stable et complexe comme le SHIME® (*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*), dont notre laboratoire sera prochainement équipé, pourrait permettre de mieux définir des groupes de bactéries pouvant être la/les source(s) de l'AHL 3-oxo-C12:2.

La concentration de l'AHL 3-oxo-C12 *in vivo* varie selon la niche écologique de *P. aeruginosa*. Ainsi elle est faible dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, de l'ordre de

1 à 22nM (Erickson *et al.* 2002) tandis qu'elle peut atteindre une concentration de 300-600µM dans des biofilms (Charlton *et al.* 2000), lesquels ont été mis en évidence dans les poumons de malades de la mucoviscidose (Singh *et al.* 2000).

Plusieurs études *in vitro* reportent un effet anti-inflammatoire sur des cellules immunitaires à des concentrations comprises entre 1 et 55µM (Bao *et al.* 2017; Hooi *et al.* 2004; Kravchenko *et al.* 2008; Ritchie *et al.* 2005) bien que les résultats d'un autre groupe soient contradictoires (Telford *et al.* 1998). Les données de différentes études convergent en revanche vers un rôle pro-inflammatoire de l'AHL 3-oxo-C12 dans des modèles *in vitro* de fibroblastes ou de cellules épithéliales (Jahoor *et al.* 2008; Shiner *et al.* 2006; Smith *et al.* 2001; Smith *et al.* 2002) ou bien chimiotactiques sur des neutrophiles (Karlsson *et al.* 2012a; Wagner *et al.* 2007; Zimmermann *et al.* 2006). Le travail de notre laboratoire, dans le cadre du projet de thèse d'Agathe Peyrottes, a permis de montrer que l'AHL 3-oxo-C12 exerce des effets anti-inflammatoires de 1 à 10µM dans les cellules Caco-2/TC7 (Thèse d'Agathe Peyrottes 2019). De façon intéressante, ce travail a également montré que la nouvelle AHL 3-oxo-C12:2 exerce aussi des effets anti-inflammatoires jusqu'à la concentration de 50µM (Thèse d'Agathe Peyrottes 2019). Enfin, toutes les études *in vitro* ayant mis en évidence l'altération des jonctions serrées et de la barrière épithéliale par l'AHL 3-oxo-C12 ont employé des concentrations comprises entre 100 et 200µM (Schwarzer *et al.* 2014; Vikstrom *et al.* 2010; Vikstrom *et al.* 2009; Vikstrom *et al.* 2006) ou 200 à 400µM (Eum *et al.* 2014).

Nous avons ainsi pu nous appuyer sur les données de l'équipe et celles de la littérature portant sur l'AHL 3-oxo-C12 pour le choix de la concentration des AHLs (150µM) employée *in vitro* dans la lignée Caco-2/TC7. Nos résultats ont néanmoins permis d'aller plus loin et de montrer que l'impact délétère de l'AHL 3-oxo-C12 semble dose-dépendant (et ne survient pas à faible dose) dans la lignée Caco-2/TC7, tandis que l'AHL 3-oxo-C12:2 protège les jonctions serrées dès 10µM.

Bien qu'il ait été montré que l'AHL 3-oxo-C12 pénètre en quelques minutes dans les cellules eucaryotes (Ritchie *et al.* 2007; Williams *et al.* 2004), peu d'études se sont intéressées à la stabilité et au devenir des AHLs, dont le noyau lactone est sensible à la dégradation ou à l'hydrolyse (Figure 18). Notre laboratoire (Thèse d'Agathe Peyrottes 2019) a montré que les deux AHLs se dégradent en quelques heures dans un milieu de culture à 37°C, n'ayant pas été en contact avec des cellules : la demi-vie de l'AHL 3-oxo-C12 est de 3.8h et celle de l'AHL 3-oxo-C12:2 de 4.8h, plus de 90% des produits de dégradation aboutissant à une forme avec un noyau lactone ouvert. En revanche, en contact avec les cellules Caco-2/TC7, après une entrée

rapide dans les cellules, la forme ouverte des deux AHLs prédomine en quelques minutes (Thèse d'Agathe Peyrottes 2019).

Les mammifères expriment des protéines de la famille des PON (Furlong *et al.* 2016), enzymes à activité lactonase, qui peuvent hydrolyser le noyau lactone des AHLs (Teiber *et al.* 2008). Il a été montré que les cellules de la lignée Caco-2 expriment les trois gènes codant les PONs et sécrètent PON-1 au pôle basolatéral et PON-2 au pôle apical (Shamir *et al.* 2005); nous avons constaté que le clone Caco-2/TC7 exprime les gènes PON-2 et PON-3 (d'après des données non montrées d'analyse par RT-qPCR).

Nous avons donc choisi de traiter systématiquement les cellules avec l'inhibiteur des PON, la **2-HydroxyQuinoline (2HQ)**, afin de pouvoir étudier les effets des AHLs sur la barrière *in vitro* en limitant leur dégradation par les PONs, et toutes les données présentées ont été réalisées dans ces conditions. Néanmoins, nous avons voulu déterminer si les effets des deux AHLs étaient différents lorsque l'inhibiteur 2HQ n'était pas présent, en supposant que les PON exprimées puissent hydrolyser les AHLs : les trois expériences indépendantes réalisées ont montré des **résultats discordants** et nous n'avons pas pu conclure. Alors que certaines études montrent que l'intégrité du noyau lactone est requise pour observer les effets *in vitro* de l'AHL **3-oxo-C12** (Kravchenko *et al.* 2006) ou d'analogues (Chhabra *et al.* 2003), les résultats de plusieurs groupes montrent au contraire que l'hydrolyse du noyau lactone par PON2 est nécessaire pour observer les effets de l'AHL sur l'acidification cellulaire (Horke *et al.* 2015) ou l'apoptose (Tao *et al.* 2016; Zhao *et al.* 2016). Eu égard aux données du laboratoire montrant que 90% de la quantité de l'inhibiteur 2HQ ajouté dans le milieu de culture reste extracellulaire, il a été proposé que le noyau lactone intact contribue à faciliter l'entrée dans les cellules de l'AHL, qui, subissant une hydrolyse spontanée ou enzymatique, est piégée dans le compartiment intracellulaire et y exerce ses effets biologiques (Thèse d'Agathe Peyrottes 2019). Il reste toutefois à clarifier quelle(s) forme(s) des AHLs sont **biologiquement actives**.

En collaboration avec Jean-Maurice Mallet (Laboratoire des biomolécules, département de Chimie de l'École Normale Supérieure) et grâce au travail de synthèse chimique d'Agathe Peyrottes, nous avons mis au point plusieurs **analogues des AHLs non hydrolysables** ou plus efficaces d'un point de vue biologique dont certains font l'objet d'un brevet (FR 1911861) et dont les effets sur la fonction de barrière et sur l'inflammation sont en cours d'étude.

L'existence d'un ou plusieurs récepteurs (membranaires ou intracellulaires) de l'AHL **3-oxo-C12** pouvant médier ses divers effets sur les cellules eucaryotes reste ambiguë. Alors que des études montrent que l'AHL se lie au facteur de transcription PPAR γ (Cooley *et al.* 2010) et

inhibe *in vitro* sa liaison à l'ADN (Jahoor *et al.* 2008), un autre groupe montre que les effets de l'AHL sont indépendants de PPAR γ (Glucksam-Galnoy *et al.* 2013). Plusieurs études soulignent un rôle protecteur de l'activation de PPAR γ par des agonistes sur les jonctions serrées et la fonction de barrière intestinale *in vivo* (Ponferrada *et al.* 2007; Ramakers *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2018) et *in vitro* dans des cellules épithéliales (Ogasawara *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2018) ou endothéliales (Huang *et al.* 2009). Étant donné la possibilité que ce facteur de transcription soit un interactant d'AHL et au vu de nos résultats ayant montré un rôle stabilisateur et protecteur de l'AHL 3-oxo-C12:2 sur les jonctions serrées *in vitro*, il serait intéressant d'étudier l'éventuelle implication de PPAR γ , dont l'expression est diminuée dans la RCH (Dubuquoy *et al.* 2003). Évaluer si l'expression de gènes cibles de PPAR γ est modifiée en réponse à l'AHL 3-oxo-C12:2 ou bien si les effets protecteurs de l'AHL sont réprimés en présence d'antagonistes de PPAR γ pourrait apporter des éléments de réponse. Néanmoins, étant donné que nos résultats ont montré que les AHLs ne modifient pas le niveau de transcrits des gènes codant les protéines de jonctions serrées, cette piste moléculaire ne semble pas la plus probable.

Le récepteur au goût amer T2R38 est également un interactant identifié de l'AHL 3-oxo-C12 (Gaida *et al.* 2016; Maurer *et al.* 2015), bien que cela soit contesté (Verbeurgt *et al.* 2017). Nos expériences pilotes d'inhibition de T2R38 (non montrées) n'ont pas apporté d'éléments en faveur de l'implication de ce récepteur dans les effets observés sur la barrière épithéliale dans nos conditions.

Plusieurs études montrent que l'AHL 3-oxo-C12 interagit avec la protéine IQGAP1 et diminue son expression (Karlsson *et al.* 2012b ; Gaida *et al.* 2016; Kumar *et al.* 2018). IQGAP1 est une protéine d'échafaudage du cytosquelette (Abel *et al.* 2015) qui interagit avec de nombreuses protéines d'adhésion cellule-cellule, notamment des jonctions adhérentes (Hedman *et al.* 2015), et constitue donc un bon candidat dans notre contexte d'étude. Cependant, des résultats préliminaires montrant que son expression et sa localisation ne sont pas modifiées en réponse aux AHLs, ainsi que l'absence d'outils permettant de montrer une interaction avec l'AHL 3-oxo-C12:2, ne nous ont pas amenés à poursuivre dans cette voie.

Un groupe étudiant les propriétés de liaison de l'AHL 3-oxo-C12 avec les membranes plasmiques propose que cette interaction soit médiée par un récepteur membranaire (Davis *et al.* 2010). Des données de notre équipe, issues d'expériences de compétition dans la lignée Caco-2/TC7, montrent que la localisation membranaire de l'AHL 3-oxo-C12 couplée à un fluorochrome est atténuée en présence de l'AHL 3-oxo-C12:2, suggérant que les deux AHLs ont des interactants ou récepteurs membranaires communs (Thèse d'Agathe Peyrottes

2019). Ainsi, la mise au point de dérivés de l'AHL **3-oxo-C12:2** couplés à un fluorochrome ou à la biotine, dont nous ne disposons pas actuellement et qui existent pour l'AHL **3-oxo-C12**, serait un outil déterminant dans l'identification de partenaires protéiques de cette nouvelle AHL.

II. STABILITE & ENDOCYTOSE DES JONCTIONS SERREES

L'un des résultats majeurs de notre étude est la mise en évidence d'un effet bénéfique de l'AHL **3-oxo-C12:2** sur les jonctions serrées et sa capacité à stabiliser les protéines de ces complexes au niveau des contacts cellule-cellule.

L'internalisation des complexes jonctionnels est un des mécanismes de déstabilisation physiopathologique des jonctions intercellulaires qui survient en réponse à l'inflammation intestinale (Ivanov *et al.* 2010; Lechuga *et al.* 2017). L'endocytose des protéines transmembranaires (TM) des jonctions serrées peut s'exécuter selon différentes voies (Utech *et al.* 2010) : l'endocytose clathrine-dépendante est impliquée dans l'internalisation de la E-Cadhérine, de la Tricelluline et de l'Occludine (Fletcher *et al.* 2012; Ivanov *et al.* 2004; Yamaki *et al.* 2014), cette dernière étant aussi endocytée par la voie cavéoline-dépendante (Marchiando *et al.* 2010; Schwarz *et al.* 2007; Shen *et al.* 2005) et par macropinocytose (Bruewer *et al.* 2005). Suite à leur internalisation, les protéines TM de jonctions peuvent entrer dans la voie de dégradation mais également être recyclées à la membrane (Stamatovic *et al.* 2017), comme cela a été montré pour l'Occludine (Yamaki *et al.* 2014). En outre, plusieurs études ont montré que l'internalisation de l'Occludine survient en réponse aux cytokines pro-inflammatoires TNF α et/ou IFN γ *in vitro* (Bruewer *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005; Utech *et al.* 2005) et *in vivo* (Clayburgh *et al.* 2005; Su *et al.* 2013).

L'ubiquitination est l'une des modifications post-traductionnelles les plus répandues et la diversité du 'code ubiquitine' lui confère un rôle dans de nombreux processus cellulaires (Swatek *et al.* 2016), y compris dans l'endocytose et le trafic de protéines transmembranaires (Foot *et al.* 2017; Piper *et al.* 2014; Tanno *et al.* 2013). Peu d'études se sont intéressées à l'ubiquitination des protéines de jonctions serrées et la majorité des travaux a porté sur des modifications de l'état de phosphorylation de ces protéines, modifiant la stabilité des jonctions serrées (Van Itallie *et al.* 2018). Par exemple, la phosphorylation de l'Occludine a été largement étudiée, et de nombreux sites de phosphorylation ont été identifiés (Dörfel *et al.* 2012). La phosphorylation de certains résidus favorise sa localisation jonctionnelle et leur déphosphorylation corrèle avec une perméabilité augmentée dans plusieurs études *in vitro*

(Farshori *et al.* 1999; Tsukamoto *et al.* 1999; Wong 1997), tandis que la phosphorylation d'autres acides aminés déstabilise les complexes jonctionnels (Antonetti *et al.* 1999; Dorfel *et al.* 2013). On peut mentionner qu'une seule étude suggère que la Tricelluline est aussi phosphorylée (Ikenouchi *et al.* 2005).

De façon intéressante, trois études portant respectivement sur la Claudine-1, la E-Cadhérine et l'Occludine établissent un lien entre la phosphorylation de ces protéines TM et leur ubiquitination qui régule leur endocytose et leur trafic (Fujita *et al.* 2002; Murakami *et al.* 2009; Shiomi *et al.* 2015).

Nos résultats ont montré que les cytokines IFN γ et TNF α induisent une augmentation de l'ubiquitination de l'Occludine et Tricelluline aux contacts cellule-cellule, et que l' AHL 3-oxo-C12:2 peut supprimer ou atténuer cet effet. L'accumulation des formes ubiquitinylées de l'Occludine et de la Tricelluline lors de l'inhibition de l'endocytose (*via* l'inhibition de la dynamine) suggère que l'ubiquitination de ces deux protéines survient à la membrane plasmique et qu'elle peut médier leur endocytose en réponse aux cytokines. Utiliser des inhibiteurs spécifiques des différentes voies de l'endocytose permettrait de mieux discriminer celles impliquées dans nos conditions. De plus, la fraction endocytée de l'Occludine peut être stockée, en fonction de son devenir, dans divers compartiments du trafic intracellulaire (Ivanov *et al.* 2004; Stamatovic *et al.* 2017) et également recyclée à la membrane (Ivanov *et al.* 2004; Stamatovic *et al.* 2017; Yamaki *et al.* 2014). Étudier la co-localisation des formes ubiquitinylées de l'Occludine ou Tricelluline avec des marqueurs des différents compartiments (endosomes précoces ou tardifs, lysosomes) apporterait de nouvelles informations sur les mécanismes cellulaires de déstructuration des jonctions serrées par les cytokines IFN γ et TNF α . La E3-ubiquitine-ligase Nedd4-2 interagit avec l'Occludine, régulant son internalisation et l'augmentation de perméabilité associée (Raikwar *et al.* 2010) et l'Occludine et la Tricelluline sont toutes deux ubiquitinylées par la E3-Ubiquitine-ligase Itch (Jennek *et al.* 2017; Traweger *et al.* 2002). Nous avons montré que cette dernière interagit à la membrane plasmique avec l'Occludine et la Tricelluline et que leur interaction, qui est augmentée en présence des cytokines IFN γ et TNF α , est modérée par l' AHL 3-oxo-C12:2. Nous avons confirmé cette interaction par des méthodes biochimiques d'immunoprécipitation et Western-blot (données non montrées). Nous proposons que l' AHL 3-oxo-C12:2 exerce des effets protecteurs sur l'intégrité des jonctions serrées en modérant l'ubiquitination de l'Occludine et de la Tricelluline induite par les cytokines et médiée par Itch, prévenant ainsi leur endocytose. Nous n'avons pas étudié l'implication d'autres ubiquitine-ligases (comme Nedd4-2) dont il serait intéressant de déterminer si le profil d'interaction avec les protéines de jonctions est le même.

Dans nos expériences complémentaires, nos résultats préliminaires (non montrés) n'ont pas indiqué une modification de la quantité ou de la localisation de la protéine Itch en réponse à l'AHL **3-oxo-C12:2**, ne permettant pas d'identifier une piste de **mécanisme cellulaire expliquant la modulation de l'interaction d'Itch avec l'Occludine ou Tricelluline**. Il faut préciser que notre étude *in vitro* est entièrement réalisée sur des protéines endogènes rendant donc certaines approches de biologie cellulaire difficilement exploitables. Ainsi, **la mise au point d'outils techniques permettant l'identification d'interactants de l'AHL 3-oxo-C12:2** (comme des formes couplées à un fluorochrome ou biotinylées) sera une stratégie indispensable pour aller plus loin dans la caractérisation des mécanismes protecteurs de cette nouvelle AHL.

Un défaut de barrière, notamment une perméabilité intestinale augmentée et une altération des jonctions intercellulaires, est une des caractéristiques majeures des MICI et ne se limite pas à ces pathologies (Choi *et al.* 2017; Odenwald *et al.* 2013) (Tableau 3, p. 45). Qu'ils aient un rôle causal ou bien qu'ils soient une conséquence de la physiopathologie des MICI, la déstabilisation des jonctions intercellulaires et un défaut de barrière intestinal participent au maintien et à l'aggravation de l'inflammation de la muqueuse intestinale en permettant un passage accru de macromolécules notamment d'origine microbienne (Figure 14, p. 48, (Neurath 2014)).

Cibler les jonctions serrées comme moyen de 'restaurer' la barrière a été suggéré par plusieurs études exploitant l'inhibition pharmacologique de la MLCK, dont l'expression et l'activité enzymatique sont augmentées dans les MICI (Blair *et al.* 2006), et qui ont montré que cette stratégie prévient *in vivo* la déstructuration des jonctions serrées et l'augmentation de perméabilité, ainsi que la sévérité de la colite subséquente (Clayburgh *et al.* 2005; Liu *et al.* 2013). Néanmoins, étant donné que l'isoforme longue de la MLCK, exprimée dans les épithélia, possède le même domaine catalytique que l'isoforme courte, exprimée dans les muscles lisses (He *et al.* 2020), l'inhibition pharmacologique de l'activité de la kinase comme stratégie thérapeutique reste inapplicable à ce jour. Cependant, un travail récent a montré l'efficacité d'une petite molécule (nommée *Divertin*) contre l'altération de la barrière *in vitro* et la colite *in vivo* en bloquant le recrutement du variant épithélial MLCK1 au niveau de la ceinture d'actine contractile (Graham *et al.* 2019). Une étude récente a exploré *in vitro* le rôle des deux molécules chimiques ECU et ML327 (initialement connues comme des stimulateurs de l'expression de la E-Cadhérine) : les résultats montrent que les effets protecteurs contre l'altération de la barrière induite par l'IFN γ et le TNF α dans plusieurs lignées épithéliales sont, entre autres, dus à

l'inhibition de l'endocytose des protéines jonctionnelles et de l'apoptose, indépendamment de l'expression de la E-Cadhérine (Cao *et al.* 2020).

Ces données mettent en avant la perspective thérapeutique que pourraient constituer les **molécules chimiques pour lesquelles des propriétés de renforcement des jonctions serrées seraient démontrées**. Au regard des effets protecteurs de l'AHL **3-oxo-C12:2** que nous avons démontrés sur les jonctions serrées, ces approches encouragent à poursuivre l'**étude de molécules du QS ou d'analogues dans le contexte des MICI** afin de mieux caractériser leurs effets sur l'ensemble des acteurs de la barrière intestinale.

III. BARRIÈRE INTESTINALE, REPARATION & INFLAMMATION

En conditions physiologiques dans l'intestin, l'extrusion des cellules épithéliales participe à maintenir l'intégrité de la monocouche sans rupture de la barrière (Gagliardi *et al.* 2019). En revanche, l'extrusion massive et la mort des cellules épithéliales (entre autres par apoptose) (Blander 2018; Delgado *et al.* 2016), induites par les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , participent à l'altération de la barrière intestinale dans les MICI (Zeissig *et al.* 2004; Zeissig *et al.* 2007) ainsi que dans des modèles *in vitro* (Gitter *et al.* 2000) et *in vivo* (Su *et al.* 2013).

Alors que nous avons montré *in vitro* que l'AHL **3-oxo-C12** potentialise de façon très marquée les effets des cytokines IFN γ et TNF α sur la perméabilité paracellulaire, nos résultats concernant l'altération de l'intégrité des jonctions intercellulaires n'ont pas montré clairement une exacerbation des effets délétères des cytokines par l'AHL sur les jonctions. Ayant postulé que cet effet synergique pourrait être médié par une augmentation de la mort cellulaire et/ou de l'extrusion des cellules épithéliales, nos résultats complémentaires basés sur l'utilisation d'inhibiteurs des caspases ou de la kinase ROCK suggèrent que la mort cellulaire par apoptose - et l'extrusion dans une moindre mesure - concourent au **passage non contrôlé de macromolécules dans des conditions inflammatoires** et sous l'effet de l'AHL **3-oxo-C12** de *P. aeruginosa*. En accord avec les nombreuses démonstrations du rôle pro-apoptotique de cette molécule (Tableau p. 67-68), ces données illustrent le fait que *P. aeruginosa* exploite par divers moyens, dont le QS, les points fragiles de la barrière épithéliale pour s'y introduire (Golovkine *et al.* 2016).

Par ailleurs, la mise en évidence d'une augmentation de l'apoptose et de l'extrusion dans nos conditions inflammatoires nous a conduit à faire l'hypothèse que la perte de contrôle du

passage de macromolécules, lors de cette rupture de barrière, masque les effets protecteurs de l'AHL 3-oxo-C12:2 sur les jonctions serrées, empêchant ainsi de démontrer un effet bénéfique au niveau fonctionnel de cette nouvelle molécule.

Les protéines de jonctions serrées sont elles-mêmes des cibles de l'apoptose, qui peut donc également par ce biais participer à la rupture de la barrière épithéliale : l'Occludine et la Tricelluline subissent toutes deux un clivage caspase-dépendant (au niveau de leur domaine cytoplasmique C-terminal), induisant leur dissociation des contacts cellule-cellule (Bojarski *et al.* 2004; Janke *et al.* 2019). La fragmentation de l'Occludine (et de ZO-1 et ZO-2) survient en réponse à divers inducteurs de l'apoptose dont le TNF α (Bojarski *et al.* 2004). Notre étude par Western-blot automatisé de ces protéines des jonctions serrées ne nous a pas permis d'analyser l'éventuelle présence de fragments clivés. Il serait intéressant d'étudier si le clivage de l'Occludine et de la Tricelluline est impliqué dans les effets des cytokines IFN γ et TNF α que nous observons et si l'AHL 3-oxo-C12:2 peut moduler la fragmentation de ces protéines, stabilisant ainsi leur présence à la membrane.

Après des dommages importants de la muqueuse intestinale, une succession d'évènements permettent de rétablir l'intégrité épithéliale : (i) la contraction des villosités réduisant la surface à réparer, (ii) la migration des cellules épithéliales pour recouvrir la lame basale exposée (processus appelé la restitution épithéliale), et enfin (iii) la fermeture de l'espace paracellulaire par le réassemblage des jonctions serrées (Blikslager *et al.* 2007). L'AHL 3-oxo-C12 module la migration de cellules épithéliales dans un essai *in vitro* de 'wound healing' (Karlsson *et al.* 2012b). Il serait donc intéressant d'étudier les propriétés de l'AHL 3-oxo-C12:2 sur les processus de migration et de comblement des brèches épithéliales.

Les études de la barrière intestinale dans des modèles complémentaires tels que les organoïdes intestinaux permettent d'intégrer les différents types de cellules épithéliales (Pearce *et al.* 2018a; Sato *et al.* 2009). Ces modèles semblent particulièrement utiles dans le contexte des MICI dans lesquelles les interactions entre les différents acteurs de l'intestin sont des éléments clés de la physiopathologie et peuvent permettre de mieux discriminer la participation de chacun, par rapport aux modèles *in vivo* (Pearce *et al.* 2018b). Dans le cadre de notre étude, ce modèle est intéressant puisqu'il permet également d'étudier les phénomènes de mort cellulaire et/ou restitution de l'intégrité de la barrière dans un modèle épithélial en 3D, en réponse à l'IFN γ (Bardenbacher *et al.* 2019; Farin *et al.* 2014) et aux AHLs, dans notre cas.

Nous avons constaté que les AHLs **3-oxo-C12** et **3-oxo-C12:2** induisent l'arrêt du développement des organoïdes à une concentration élevée (150µM) et que l'IFN γ conduit à la mort des organoïdes au-delà de 1ng/mL, montrant ainsi que les doses employées *in vitro* dans une lignée comme Caco-2/TC7 exprimant des pompes d'efflux (Brück *et al.* 2017; Zeller *et al.* 2015) ne sont pas transposables à des modèles plus physiologiques. Nos résultats préliminaires, qui ont montré que l'AHL **3-oxo-C12:2** atténue l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques induite par l'IFN γ , **sont encourageants mais restent à confirmer et approfondir.**

Par ailleurs, les organoïdes ont été exposés aux AHLs au niveau du pôle basolatéral (à l'exception du premier jour, stade auquel les cryptes sontensemencées à l'état ouvert permettant en théorie un accès du pôle apical). Nous ne disposons actuellement pas d'informations sur l'entrée de ces AHLs dans les cellules épithéliales intestinales lorsqu'elles sont apportées par le pôle basolatéral. Dans le contexte de l'étude des interactions hôte-microbiote, pour lesquelles la polarité épithéliale joue un rôle primordial, la linéarisation des organoïdes murins s'est avérée difficilement réalisable et présente le désavantage de la perte de la structure 3D. D'autres groupes montrent aujourd'hui que l'inversion de polarité des organoïdes est une technique permettant l'étude d'interactions hôtes-pathogène (Co *et al.* 2019).

Quant à l'étude de la barrière intestinale et de la perméabilité paracellulaire, les organoïdes intestinaux ont l'avantage de contenir les différents types de cellules épithéliales participant à la fonction de barrière comme les cellules à mucus et les cellules de Paneth, en plus des jonctions intercellulaires. Toutefois, ce modèle reste difficile à appréhender pour l'étude de la perméabilité paracellulaire : un modèle de micro-injection (de molécules ou microorganismes) est un outil couteux et fastidieux, limitant la répétition des réplicats. D'autres techniques, comme la mesure de l'accumulation de traceurs fluorescents dans la lumière des organoïdes (Bardenbacher *et al.* 2019), constitueraient des outils plus accessibles pour poursuivre notre étude des effets des AHLs sur la fonction de barrière dans ce modèle.

Barrière intestinale et inflammation sont étroitement liées, particulièrement dans le contexte pathologique des MICI et le système immunitaire est un acteur clé dans la régulation de la fonction de barrière. Nous avons évoqué le rôle immunomodulateur de l'AHL **3-oxo-C12**, dont les effets ont été reportés dans divers types de cellules immunitaires. Dans le contexte de notre étude, nous avons donc analysé l'expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales en réponse aux AHLs. Nous avons montré que l'AHL **3-oxo-C12** potentialise les effets pro-inflammatoires des cytokines IFN γ et TNF α , alors que l'AHL

insaturée **3-oxo-C12:2** pourrait avoir un rôle modulateur de l'inflammation dans les cellules épithéliales intestinales en atténuant les effets des cytokines sur l'expression du TNF α , cytokine au rôle clé dans l'altération de la barrière (Odenwald *et al.* 2016). Nous n'avons pas exploré plus amplement cette piste intéressante étant donné qu'un autre projet du laboratoire (dans le cadre du doctorat de Garance Coquant) vise à étudier le rôle des deux AHLs sur l'inflammation dans différents modèles de cellules épithéliales et immunitaires et sur le microbiote. De même, nous étudions actuellement l'impact de molécules synthétiques analogues, dont une forme non hydrolysable montre un rôle immunomodulateur prometteur (Thèse d'Agathe Peyrottes 2019).

Notre étude *in vivo*, en collaboration avec l'INRA, visait à étudier l'impact des AHLs dans un contexte de colite inflammatoire chez la souris, liant ainsi **barrière intestinale, inflammation et microbiote**. Ces expériences n'ont malheureusement pas permis de conclure sur des effets notables des AHLs sur la barrière intestinale *in vivo*. L'analyse, par Garance Coquant, de la modification de la composition du microbiote intestinal de souris en réponse à l'exposition aux AHLs a permis de montrer que la composition des groupes contrôles était très différente entre nos 3 essais, ce qui, d'une part, pourrait expliquer la variabilité des effets des AHLs sur la colite entre les expériences, et d'autre part, n'a pas permis de reproduire les résultats préliminaires de l'équipe sur l'impact des AHLs sur la composition du microbiote. Ceux-ci montraient que l'administration de l'AHL **3-oxo-C12** entraînait une augmentation des taux de Bacteroidetes tandis que l'AHL **3-oxo-C12:2** induisait une augmentation des taux de Firmicutes. De façon importante, l'analyse par spectrométrie de masse, réalisée par Garance Coquant lors de ces essais, a montré que l'AHL **3-oxo-C12** comme la **3-oxo-C12:2** sont extraites et identifiées comme intactes dans les selles de souris. Ceci nous permet de faire l'hypothèse que l'absence d'effets des AHLs ne serait pas dû à leur dégradation totale le long du tractus digestif, bien que nous ne puissions pas formellement déterminer si les cellules épithéliales sont en contact avec ces molécules et à quelles concentrations.

IV. AHLs, MICROBIOME, METABOLITES BACTERIENS & BARRIERE INTESTINALE

Les AHLs sont des molécules du QS et sont donc des **médiateurs de communication entre bactéries**. Étudier leurs effets sur la composition mais aussi les propriétés du microbiote commensal intestinal paraît indispensable. De plus, l'AHL **3-oxo-C12:2** est diminuée chez les sujets atteints de MICI, particulièrement en période de poussée, et sa présence chez certains patients est corrélée à une composition 'normale' du microbiote, notamment une abondance plus importante de Firmicutes dont *F. prausnitzii* et moindre d'*E. coli*. **Nous pouvons donc supposer qu'en plus des effets directs sur les cellules hôte par un dialogue inter-règne, les AHLs peuvent exercer des effets (bénéfiques ou délétères) sur la barrière intestinale via un rôle sur le microbiote commensal.**

Ce dernier joue un rôle important dans la résolution de l'inflammation mucosale, la réparation après une lésion et dans la fonction de barrière (Alam *et al.* 2018). Dans des modèles *in vitro*, il a été montré que les bactéries probiotiques *E. coli* souche Nissle 1917, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria infantis* et *Lactobacillus rhamnosus GG* et la bactérie commensale *Bacteroides thetaiotaomicron* augmentent l'expression de protéines de jonctions serrées et protègent contre une perturbation de la barrière épithéliale et une délocalisation des protéines de jonctions serrées (et adhérentes) induites par une infection par une souche EPEC (Zyrek *et al.* 2007), le peroxyde d'hydrogène (Ewaschuk *et al.* 2008) ou bien l'IFN γ et le TNF α (Seth *et al.* 2008; Resta-Lenert *et al.* 2006). Ces effets bénéfiques du microbiote sont également démontrés *in vivo* : l'administration du surnageant de *Bifidobacteria infantis* atténue l'augmentation de perméabilité et l'inflammation du colon dans des souris déficientes pour l'IL-10 (Ewaschuk *et al.* 2008), les souches *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 et *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* CNCM-I2494 protègent contre une colite induite par le DNBS et prévient contre la diminution des niveaux d'ARNm des gènes codant les protéines de jonctions serrées (Laval *et al.* 2015b; Martin *et al.* 2016). A l'exception de *Bacteroides thetaiotaomicron*, ces études portent toutes sur les effets de bactéries probiotiques, illustrant ainsi la possibilité de l'utilisation de ces souches comme traitement préventif ou curatif en association avec d'autres thérapies.

De façon intéressante, certains de ces effets protecteurs sont médiés par le surnageant (Ewaschuk *et al.* 2008), ou les facteurs solubles isolés de ces bactéries (Seth *et al.* 2008) ce qui renforce l'intérêt d'étudier les **métabolites ou petites molécules chimiques produites par le microbiote dans le contexte de la barrière intestinale**. L'étude par Garance Coquant des

effets des AHLs, ou des nouvelles molécules analogues, permettra donc d'apporter une meilleure connaissance du rôle de ces molécules sur le microbiote commensal et éventuellement d'en démontrer un intérêt dans le contexte des MICI.

Le rôle du microbiote commensal dans l'homéostasie intestinale repose principalement sur les métabolites qu'il produit directement ou les dérivés qu'il transforme à partir de produits de la nutrition, et qui permettent d'établir un dialogue entre la lumière de l'intestin et l'épithélium (Wang *et al.* 2019). Parmi ces nombreux métabolites, certains comme les acides gras à chaîne courte (AGCC), les métabolites du tryptophane ou des acides biliaires sont d'intérêt dans les MICI pour lesquelles le **métabolome** du microbiote est perturbé (Lavelle *et al.* 2020). Les liens entre métabolites bactériens et fonction de barrière intestinale est un champ d'étude relativement récent. Notre étude est centrée sur les AHLs, molécules du QS qui sont également médiateurs du dialogue inter-règne, et leur effets sur la barrière, mais d'autres métabolites bactériens ont été étudiés, depuis une dizaine d'années, pour leur impact sur la barrière intestinale et leur rôle commence à être mieux connu (Alam *et al.* 2018).

Parmi les AGCC, qui sont issus de la fermentation des fibres alimentaires par certaines espèces bactériennes, le **butyrate** est celui dont l'impact sur la fonction de barrière et les jonctions serrées est le plus décrit. Il accélère le réassemblage des jonctions serrées *in vitro* par la diminution de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine MLC2 *via* une cascade de signalisation impliquant l'AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*) (Miao *et al.* 2016; Peng *et al.* 2009). Il augmente l'expression des Claudines-3 et -4 et protège l'altération de la barrière induite par le LPS, comme démontré une autre étude *in vitro* montrant aussi l'implication de l'AMPK (Yan *et al.* 2017). Le rôle bénéfique du butyrate sur la perméabilité et l'expression de l'Occludine, ZO-1 et la Claudine-3 a également été montré *in vivo* (Feng *et al.* 2018). Néanmoins, les effets bénéfiques du butyrate sont à nuancer puisqu'il induit, à forte concentration, l'apoptose dans la lignée Caco-2 (Peng *et al.* 2007). Bien que les effets de l'acétate et du propionate soient moins documentés que ceux du butyrate, le mélange des trois promeut la fonction de barrière (Chen *et al.* 2017). Une étude récente montre que l'acétate augmente l'expression de la Claudine-3 et de l'Occludine dans des organoïdes murins et humains en 3D mais que c'est le butyrate qui exerce ces effets et réduit la perméabilité aux ions dans les organoïdes humains linéarisés en 2D (Pearce *et al.* 2020), ce qui souligne ici l'importance du modèle expérimental et en particulier du pôle d'apport des métabolites étudiés.

Les **acides biliaires secondaires** résultent de la biotransformation de la fraction des acides biliaires, produits par l'hôte pour la digestion, qui n'est pas absorbée dans la partie supérieure de l'intestin. L'acide lithocholique (LCA, dérivé de l'acide biliaire primaire chénodésoxycholique, CDCA) et l'acide désoxycholique (DCA, dérivé de l'acide cholique) en sont les principaux. Alors que les acides biliaires primaires cholique (Araki *et al.* 2005) et CDCA (Sarathy *et al.* 2017) augmentent la perméabilité *in vitro* par la génération de ROS et la délocalisation de l'Occludine, le LCA atténue l'augmentation de perméabilité, la génération de ROS, l'inflammation et la délocalisation de l'Occludine induits en conditions inflammatoires (Sarathy *et al.* 2017). Ces études suggèrent un rôle bénéfique des acides biliaires secondaires à l'inverse de celui des acides primaires sur la barrière épithéliale, bien qu'un effet délétère sur la perméabilité soit également reporté pour le DCA (Raimondi *et al.* 2008).

Le **tryptophane**, l'un des 9 acides aminés essentiels non synthétisable par l'Homme et présent dans les aliments, est métabolisé par l'hôte selon deux voies aboutissant à la production de sérotonine et d'acide kynurénique respectivement. Mais de nombreuses bactéries commensales utilisent également cet acide aminé comme substrat de voies métaboliques produisant des métabolites (principalement l'indole, des dérivés de l'acide indolique et de la tryptamine) qui peuvent avoir diverses fonctions (Taleb 2019; Wang *et al.* 2019).

De façon intéressante, les métabolites du tryptophane, régulent les communautés microbiennes par des effets antifongiques sur *Candida albicans* (Zelante *et al.* 2013) en atténuant sa virulence (Oh *et al.* 2012). A l'instar des molécules du QS, ces métabolites, en particulier l'indole, ont également un rôle dans la **communication bactérienne inter-espèce**, en réprimant l'expression de gènes du flagelle et de pathogénicité dans *Salmonella enterica serovar Typhimurium* et celle de gènes du QS de *P. aeruginosa* (Lee *et al.* 2009), réduisant ainsi leur virulence. Chez les sujets atteints de MICI, la dysbiose du microbiote intestinal est caractérisée, entre autres par un métabolisme du tryptophane diminué (Nikolaus *et al.* 2014) et une surreprésentation d'espèces virulentes comme *Candida albicans* (Hoarau *et al.* 2016). Dans ce contexte, **la démonstration que des métabolites bactériens peuvent réguler l'activation du QS dans certaines espèces encourage à mieux caractériser le QS au sein de l'écosystème complexe intestinal.**

Alors que le tryptophane a des effets controversés sur la fonction de barrière *in vivo* et *in vitro* (protecteurs à faible dose mais délétères à des concentrations plus élevées) (Suzuki 2020), ses métabolites bactériens comme l'indole et ses dérivés diminuent la perméabilité intestinale *in vivo* (Venkatesh *et al.* 2014) et *in vitro* en augmentant l'expression des gènes codant les

protéines de jonctions serrées et des mucines (Bansal *et al.* 2010; Shin *et al.* 2020), protégeant ainsi les cellules épithéliales de la colonisation par une souche EHEC (Bansal *et al.* 2010).

Plusieurs études suggèrent que le rôle bénéfique des métabolites du tryptophane sur l'homéostasie intestinale sont médiés par l'activation de la voie du *Aryl hydrocarbon Receptor* (AhR), dont les dérivés indole en sont des ligands (Lamas *et al.* 2016; Natividad *et al.* 2018; Zelante *et al.* 2013). AhR est un facteur de transcription qui possède de très nombreux ligands exogènes mais aussi endogènes (Nguyen *et al.* 2008) et qui est impliqué dans divers processus, au-delà de la détection de composés toxiques, en particulier dans l'immunité intestinale (Gutierrez-Vazquez *et al.* 2018; Lamas *et al.* 2018). La production par le microbiote de métabolites qui sont des ligands d'AhR est réduite dans les MICI (Lamas *et al.* 2016), mais aussi dans les maladies métaboliques également associées à un défaut de barrière (Natividad *et al.* 2018) et l'activité d'AhR est diminuée. Dans des modèles murins de ces pathologies, la stimulation de l'activité d'AhR (par des agonistes ou par la colonisation de souches productrices de ligands) prévient de la colite inflammatoire (Lamas *et al.* 2016) et de l'altération de la barrière (Natividad *et al.* 2018). De plus, ces dernières années, plusieurs études, y compris de notre laboratoire, ont montré que son activation renforce la barrière épithéliale en protégeant les jonctions serrées (Han *et al.* 2016; Yu *et al.* 2018; Ziegler *et al.* 2016; Natividad *et al.* 2018; Postal *et al.* 2020 en annexe à la fin du manuscrit).

Parmi les nombreux ligands d'AhR, figurent des composés comme les glucosinolates présents dans les végétaux de la famille des brassicacées (comprenant le brocoli et d'autres choux) (Nguyen *et al.* 2008; Carlson 1987) qui sont également des ligands du récepteur au goût amer T2R38 (Meyerhof *et al.* 2009), lequel est aussi un récepteur potentiel de l'AHL 3-oxo-C12 comme évoqué précédemment. De plus, une étude montre qu'AhR lie des facteurs de virulence (de la famille des phénazines) produites par *P. aeruginosa* et que cette détection permet à l'hôte de réguler l'infection bactérienne *in vitro* et *in vivo* (Moura-Alves *et al.* 2014). Ces observations nous ont donc amenés à nous poser la question d'un possible lien entre AHLs et AhR. Nos données préliminaires d'analyse par RT-qPCR ont montré que l'expression du gène cible d'AhR CYP1A1 est augmentée lors de l'exposition à l'AHL 3-oxo-C12:2 dans la lignée Caco-2/TC7 (données non montrées), suggérant une possible activation de la voie AhR. Poursuivre cette analyse et utiliser un antagoniste d'AhR pourrait permettre de mettre en évidence un lien entre des molécules du QS, AhR et la fonction de barrière.

Ainsi, l'ensemble de ces données met en évidence le rôle important des métabolites bactériens, qui sont des vecteurs de la communication hôte-microbiote, sur la fonction de barrière intestinale. Du fait de la dysbiose associée aux MICI, beaucoup des métabolites cités ci-dessus sont diminués dans ces pathologies (Tableau 4. p.53), participant ainsi à la rupture d'équilibre entre l'hôte et le microbiote.

L'émergence de phénotypes résistants aux antibiotiques ou antifongiques dans de nombreuses bactéries et champignons pathogènes humains, mais aussi la multiplication des études et connaissances sur les microbiotes, ont favorisé une attention accrue envers le QS comme moyen de contrôle des microorganismes (Defoirdt 2018; Rutherford *et al.* 2012).

Alors que le rôle des AHLs dans l'intestin est encore mal connu, il ne fait aucun doute qu'un intérêt croissant se portera vers les molécules du *quorum sensing*, en tant que métabolites bactériens dans le contexte de l'écosystème intestinal (Jacob *et al.* 2018; Li *et al.* 2018).

CONCLUSION

En conclusion, notre étude a permis de mieux caractériser l'impact de molécules du QS sur la fonction de barrière intestinale, qui est un acteur majeur dans l'homéostasie intestinale et qui est perturbée dans les MICI. Nous avons mis en évidence le rôle aggravateur de l'AHL **3-oxo-C12** de *P. aeruginosa* dans un contexte inflammatoire, soulignant des mécanismes impliqués dans la pathogénicité de cette bactérie ubiquitaire, responsable de nombreuses infections ciblant divers épithélia et dont l'antibiorésistance en fait un problème de santé publique. Nous avons pu montrer un rôle bénéfique sur la fonction de barrière de la **3-oxo-C12:2**, AHL majoritaire dans l'écosystème intestinal humain et qui est perdue au cours des MICI. La mise au point de nouvelles molécules, stables et aux propriétés renforcées, et la démonstration de leurs effets bénéfiques dans différents modèles, particulièrement *in vivo*, constitueront une perspective intéressante. Dans le contexte de l'écosystème intestinal, l'approfondissement de ces recherches devront intégrer toutes les propriétés de ces nouvelles AHLs sur l'épithélium intestinal mais aussi sur le microbiote et l'inflammation, afin d'envisager une visée potentiellement thérapeutique de ces molécules du QS dans les MICI. La poursuite de l'étude du *quorum sensing* dans l'intestin pourra ainsi permettre d'identifier de nouveaux mécanismes favorisant, au sein de cet écosystème, l'équilibre qui est rompu dans de nombreuses pathologies.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abel, A. M., K. M. Schuldt, K. Rajasekaran, D. Hwang, M. J. Riese, S. Rao, . . . S. Malarkannan. 2015. 'IQGAP1: insights into the function of a molecular puppeteer', *Mol Immunol*, 65: 336-49.
- Abrams, Gerald D, Heinz Bauer, and Helmunz Sprinz. 1962. "Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice." In : MOUNT SINAI HOSPITAL NEW YORK.
- Adachi, Makoto, Akihito Inoko, Masaki Hata, Kyoko Furuse, Kazuaki Umeda, Masahiko Itoh, and Shoichiro Tsukita. 2006. 'Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein', *Molecular and cellular biology*, 26: 9003-15.
- Ahlgren, Nathan A, Caroline S Harwood, Amy L Schaefer, Eric Giraud, and E Peter Greenberg. 2011. 'Aryl-homoserine lactone quorum sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 7183-88.
- Akbar, Noor, Naveed Ahmed Khan, K. Sagathevan, Mazhar Iqbal, Abdul Tawab, and Ruqaiyyah Siddiqui. 2019. 'Gut bacteria of Cuora amboinensis (turtle) produce broad-spectrum antibacterial molecules', *Scientific reports*, 9: 17012.
- Al-Sadi, R., Shuhong Khatib K Fau - Guo, Dongmei Guo S Fau - Ye, Moustafa Ye D Fau - Youssef, Thomas Youssef M Fau - Ma, and T. Ma. 2011. 'Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Al-Sadi, R. M., and T. Y. Ma. 2007. 'IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability', *J Immunol*.
- Al-Sadi, Rana, Shuhong Guo, Karol Dokladny, Matthew A. Smith, Dongmei Ye, Archana Kaza, . . . Thomas Y. Ma. 2012. 'Mechanism of Interleukin-1 β Induced-Increase in Mouse Intestinal Permeability In Vivo', *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 32: 474-84.
- Alam, A., and A. Neish. 2018. 'Role of gut microbiota in intestinal wound healing and barrier function', *Tissue Barriers*, 6: 1539595.
- Allaire, J. M., S. M. Crowley, H. T. Law, S. Y. Chang, H. J. Ko, and B. A. Vallance. 2018. 'The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity', *Trends Immunol*, 39: 677-96.
- Amieva, Manuel R., Roger Vogelmann, Antonello Covacci, Lucy S. Tompkins, W. James Nelson, and Stanley Falkow. 2003. 'Disruption of the Epithelial Apical-Junctional Complex by Helicobacter pylori CagA', *Science*, 300: 1430-34.
- Anderson, C. A., G. Boucher, C. W. Lees, A. Franke, M. D'Amato, K. D. Taylor, . . . J. D. Rioux. 2011. 'Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47', *Nat Genet*, 43: 246-52.
- Anderson, J. M., and C. M. Van Itallie. 2009. 'Physiology and function of the tight junction', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a002584.
- Andersson, Roland E., Gunnar Olaison, Curt Tysk, and Anders Ekblom. 2001. 'Appendectomy and Protection against Ulcerative Colitis', *New England Journal of Medicine*, 344: 808-14.
- Andrews, Caroline, Mairi H. McLean, and Scott K. Durum. 2018. 'Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function', *Frontiers in Immunology*, 9: 1270.
- Antonetti, D. A., A. J. Barber, L. A. Hollinger, E. B. Wolpert, and T. W. Gardner. 1999. 'Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors', *J Biol Chem*, 274: 23463-7.
- Araki, Yoshio, Takuji Katoh, Atsushi Ogawa, Shigeki Bamba, Akira Andoh, Shigeki Koyama, . . . Tadao Bamba. 2005. 'Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line', *Free Radical Biology and Medicine*, 39: 769-80.
- Araujo, J. R., J. Tomas, C. Brenner, and P. J. Sansonetti. 2017. 'Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity', *Biochimie*, 141: 97-106.

- Ariffin, Hany, Parasakthi Navaratnam, Tan Kah Kee, and Ganeswarie Balan. 2004. 'Antibiotic resistance patterns in nosocomial gram-negative bacterial infections in units with heavy antibiotic usage', *Journal of tropical pediatrics*, 50: 26-31.
- Arnold, T. R., R. E. Stephenson, and A. L. Miller. 2017. 'Rho GTPases and actomyosin: Partners in regulating epithelial cell-cell junction structure and function', *Exp Cell Res*, 358: 20-30.
- Artursson, Per. 1990. 'Epithelial Transport Of Drugs In Cell Culture. I: A Model For Studying The Passive Diffusion Of Drugs Over Intestinal Absorbative (Caco-2) Cells', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79: 476-82.
- Asano, Yasunari, Tetsuya Hiramoto, Ryo Nishino, Yuji Aiba, Tae Kimura, Kazufumi Yoshihara, . . . Nobuyuki Sudo. 2012. 'Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303: G1288-G95.
- Atkinson, Steve, John P Throup, Gordon SAB Stewart, and Paul Williams. 1999. 'A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping', *Molecular Microbiology*, 33: 1267-77.
- Autret, Nicolas, Catherine Raynaud, Iharilalao Dubail, Patrick Berche, and Alain Charbit. 2003. 'Identification of the agr locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence', *Infection and Immunity*, 71: 4463-71.
- Balda, Maria S., and Karl Matter. 2000. 'The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression', *The EMBO Journal*, 19: 2024-33.
- Bansal, Tarun, Robert C. Alaniz, Thomas K. Wood, and Arul Jayaraman. 2010. 'The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 228-33.
- Bansal, Tarun, Palmy Jesudhasan, Suresh Pillai, Thomas K. Wood, and Arul Jayaraman. 2008. 'Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78: 811-19.
- Bao, Lei, Jialin Yu, Haiying Zhong, Daochao Huang, and Qi Lu. 2017. 'Expression of toll-like receptors in T lymphocytes stimulated with N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa*', *APMIS*, 125: 553-57.
- Bardenbacher, Marco, Barbara Ruder, Nathalie Britzen-Laurent, Benjamin Schmid, Maximilian Waldner, Elisabeth Naschberger, . . . Philipp Tripal. 2019. 'Permeability analyses and three dimensional imaging of interferon gamma-induced barrier disintegration in intestinal organoids', *Stem Cell Research*, 35: 101383.
- Barker, N. 2014. 'Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 19-33.
- Barker, N., and H. Clevers. 2007. 'Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells', *Gastroenterology*, 133: 1755-60.
- Barriuso, Jorge, Deborah A Hogan, Tajalli Keshavarz, and Maria Jesús Martínez. 2018. 'Role of quorum sensing and chemical communication in fungal biotechnology and pathogenesis', *FEMS Microbiology Reviews*, 42: 627-38.
- Bastida, Guillermo, and Belén Beltrán. 2011. 'Ulcerative colitis in smokers, non-smokers and ex-smokers', *World journal of gastroenterology: WJG*, 17: 2740.
- Battle, M. A., G. Konopka, F. Parviz, A. L. Gaggli, C. Yang, F. M. Sladek, and S. A. Duncan. 2006. 'Hepatocyte nuclear factor 4alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 8419-24.
- Bauer, E., B. A. Williams, H. Smidt, M. W. Versteegen, and R. Mosenthin. 2006. 'Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals', *Curr Issues Intest Microbiol*, 7: 35-51.
- Baumgart, Daniel C., and William J. Sandborn. 2012. 'Crohn's disease', *The Lancet*, 380: 1590-605.
- Baumgart, Martin, Belgin Dogan, Mark Rishniw, Gil Weitzman, Brian Bosworth, Rhonda Yantiss, . . . Kenneth W. Simpson. 2007. 'Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum', *The ISME Journal*, 1: 403-18.

- Benchimol, E. I., D. R. Mack, A. Guttman, G. C. Nguyen, T. To, N. Mojaverian, . . . D. G. Manuel. 2015. 'Inflammatory bowel disease in immigrants to Canada and their children: a population-based cohort study', *Am J Gastroenterol*, 110: 553-63.
- Blair, S. A., S. V. Kane, D. R. Clayburgh, and J. R. Turner. 2006. 'Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease', *Lab Invest*, 86: 191-201.
- Blander, J. M. 2018. 'On cell death in the intestinal epithelium and its impact on gut homeostasis', *Curr Opin Gastroenterol*, 34: 413-19.
- Blikslager, Anthony T., Adam J. Moeser, Jody L. Gookin, Samuel L. Jones, and Jack Odle. 2007. 'Restoration of Barrier Function in Injured Intestinal Mucosa', *Physiological Reviews*, 87: 545-64.
- Boehm, D., M. Krzystek-Korpacka, K. Neubauer, M. Matusiewicz, I. Berdowska, B. Zielinski, . . . A. Gamian. 2009. 'Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis', *Inflamm Bowel Dis*, 15: 93-9.
- Bojarski, Christian, Jörg Weiske, Torsten Schöneberg, Werner Schröder, Joachim Mankertz, Jörg-Dieter Schulzke, . . . Otmar Huber. 2004. 'The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells', *Journal of cell science*, 117: 2097-107.
- Bosi, E., L. Molteni, M. G. Radaelli, L. Folini, I. Fermo, E. Bazzigaluppi, . . . R. Paroni. 2006. 'Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes', *Diabetologia*, 49: 2824-7.
- Boulenc, Xavier, Eric Marti, Henri Joyeux, Claude Roques, Yves Berger, and Gérard Fabre. 1993. 'Importance of the paracellular pathway for the transport of a new bisphosphonate using the human CACO-2 monolayers model', *Biochemical Pharmacology*, 46: 1591-600.
- Braun, A., I. Treede, D. Gotthardt, A. Tietje, A. Zahn, R. Ruhwald, . . . R. Ehehalt. 2009. 'Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis', *Inflamm Bowel Dis*, 15: 1705-20.
- Bredenbruch, Florian, Robert Geffers, Manfred Nimtz, Jan Buer, and Susanne Häussler. 2006. 'The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity', *Environmental Microbiology*, 8: 1318-29.
- Brück, S., J. Strohmeier, D. Busch, M. Drozdik, and S. Oswald. 2017. 'Caco-2 cells – expression, regulation and function of drug transporters compared with human jejunal tissue', *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 38: 115-26.
- Bruewer, Matthias, Markus Utech, Andrei I. Ivanov, Ann M. Hopkins, Charles A. Parkos, and Asma Nusrat. 2005. 'Interferon- γ induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process', *The FASEB Journal*, 19: 923-33.
- Buckley, A., and J. R. Turner. 2018. 'Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10.
- Canavan, C., K. R. Abrams, and J. Mayberry. 2006. 'Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease', *Aliment Pharmacol Ther*, 23: 1097-104.
- Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, . . . R. Burcelin. 2007. 'Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance', *Diabetes*, 56: 1761-72.
- Cani, Patrice D, Rodrigo Bibiloni, Claude Knauf, Aurélie Waget, Audrey M Neyrinck, Nathalie M Delzenne, and Rémy Burcelin. 2008. 'Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice', *Diabetes*, 57: 1470-81.
- Canny, G. O., and B. A. McCormick. 2008. 'Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within?', *Infect Immun*, 76: 3360-73.
- Cao, Hui, Gomathi Krishnan, Boyan Goumnerov, John Tsongalis, Ronald Tompkins, and Laurence G. Rahme. 2001. 'A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 14613-18.
- Cao, X., L. Sun, S. Lechuga, N. G. Naydenov, A. Feygin, and A. I. Ivanov. 2020. 'A Novel Pharmacological Approach to Enhance the Integrity and Accelerate Restitution of the Intestinal Epithelial Barrier', *Inflamm Bowel Dis*.
- Carlson, D. G. 1987. 'Glucosinolates in crucifer vegetables: broccoli, brussels sprouts, cauliflower, collards, kale, mustard greens, and kohlrabi', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 112: pp. 173-0-1987 v.112 no.1.

- Carlson-Banning, K. M., and V. Sperandio. 2018. 'Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outwits hosts through sensing small molecules', *Curr Opin Microbiol*, 41: 83-88.
- Case, Rebecca J., Maurizio Labbate, and Staffan Kjelleberg. 2008. 'AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria', *The ISME Journal*, 2: 345-49.
- Cash, Heather L., Cecilia V. Whitham, Cassie L. Behrendt, and Lora V. Hooper. 2006. 'Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin', *Science*, 313: 1126-30.
- Cattin, A. L., J. Le Beyec, F. Barreau, S. Saint-Just, A. Houllier, F. J. Gonzalez, . . . A. Ribeiro. 2009. 'Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium', *Mol Cell Biol*, 29: 6294-308.
- Chapon-Hervé, Virginie, Mohammed Akrim, Amel Latifi, Paul Williams, Andrée Lazdunski, and Marc Bally. 1997. 'Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*', *Molecular Microbiology*, 24: 1169-78.
- Charlton, Timothy S, Rocky De Nys, Andrew Netting, Naresh Kumar, Morten Hentzer, Michael Givskov, and Staffan Kjelleberg. 2000. 'A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm', *Environmental Microbiology*, 2: 530-41.
- Chassaing, Benoit, and Arlette Darfeuille-Michaud. 2011. 'The Commensal Microbiota and Enteropathogens in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases', *Gastroenterology*, 140: 1720-28.e3.
- Chen, S. J., X. W. Liu, J. P. Liu, X. Y. Yang, and F. G. Lu. 2014. 'Ulcerative colitis as a polymicrobial infection characterized by sustained broken mucus barrier', *World J Gastroenterol*, 20: 9468-75.
- Chen, T., C. Y. Kim, A. Kaur, L. Lamothe, M. Shaikh, A. Keshavarzian, and B. R. Hamaker. 2017. 'Dietary fibre-based SCFA mixtures promote both protection and repair of intestinal epithelial barrier function in a Caco-2 cell model', *Food Funct*, 8: 1166-73.
- Chen, Xin, Stephan Schauder, Noelle Potier, Alain Van Dorsselaer, István Pelczer, Bonnie L. Bassler, and Frederick M. Hughson. 2002. 'Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron', *Nature*, 415: 545-49.
- Chhabra, S. R., C. Harty, D. S. Hooi, M. Daykin, P. Williams, G. Telford, . . . B. W. Bycroft. 2003. 'Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators', *J Med Chem*, 46: 97-104.
- Chhabra, Siri Ram, Bodo Philipp, Leo Eberl, Michael Givskov, Paul Williams, and Miguel Cámara. 2005. 'Extracellular communication in bacteria.' in, *The chemistry of pheromones and other semiochemicals II* (Springer).
- Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, and N. Sawada. 2008. 'Transmembrane proteins of tight junctions', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 588-600.
- Chiba, Hideki, Tomoko Gotoh, Takashi Kojima, Seiro Satohisa, Keisuke Kikuchi, Makoto Osanai, and Norimasa Sawada. 2003. 'Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells', *Experimental Cell Research*, 286: 288-97.
- Cho, I., and M. J. Blaser. 2012. 'The human microbiome: at the interface of health and disease', *Nat Rev Genet*, 13: 260-70.
- Choi, Jeongjoon, Dongwoo Shin, Minjeong Kim, Joowon Park, Sangyong Lim, and Sangryeol Ryu. 2012. 'LsrR-mediated quorum sensing controls invasiveness of *Salmonella typhimurium* by regulating SPI-1 and flagella genes', *PloS one*, 7: e37059-e59.
- Choi, W., S. Yeruva, and J. R. Turner. 2017. 'Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease', *Exp Cell Res*, 358: 71-77.
- Citi, Sandra, Pamela Pulimeno, and Serge Paschoud. 2012. 'Cingulin, paracingulin, and PLEKHA7: signaling and cytoskeletal adaptors at the apical junctional complex', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1257: 125-32.
- Clarke, Marcie B, David T Hughes, Chengru Zhu, Edgar C Boedeker, and Vanessa Sperandio. 2006. 'The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 10420-25.
- Clayburgh, D. R., T. A. Barrett, Y. Tang, J. B. Meddings, L. J. Van Eldik, D. M. Watterson, . . . J. R. Turner. 2005. 'Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo', *J Clin Invest*, 115: 2702-15.

- Co, J. Y., M. Margalef-Catala, X. Li, A. T. Mah, C. J. Kuo, D. M. Monack, and M. R. Amieva. 2019. 'Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions', *Cell Rep*, 26: 2509-20 e4.
- Consortium, Uk Ibd Genetics, J. C. Barrett, J. C. Lee, C. W. Lees, N. J. Prescott, C. A. Anderson, . . . D. P. Strachan. 2009. 'Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region', *Nat Genet*, 41: 1330-4.
- Contractor, Nikhat V., Hamid Bassiri, Tannishtha Reya, Audrey Y. Park, Daniel C. Baumgart, Mariusz A. Wasik, . . . Simon R. Carding. 1998. 'Lymphoid Hyperplasia, Autoimmunity, and Compromised Intestinal Intraepithelial Lymphocyte Development in Colitis-Free Gnotobiotic IL-2-Deficient Mice', *The Journal of Immunology*, 160: 385-94.
- Cooley, M. A., C. Whittall, and M. S. Rolph. 2010. 'Pseudomonas signal molecule 3-oxo-C12-homoserine lactone interferes with binding of rosiglitazone to human PPARgamma', *Microbes Infect*, 12: 231-7.
- Cooley, Margaret, Siri Ram Chhabra, and Paul Williams. 2008. 'N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing: A Twist in the Tail and a Blow for Host Immunity', *Chemistry & Biology*, 15: 1141-47.
- Cornuault, Jeffrey K., Marie-Agnès Petit, Mahendra Mariadassou, Leandro Benevides, Elisabeth Moncaut, Philippe Langella, . . . Marianne De Paepe. 2018. 'Phages infecting Faecalibacterium prausnitzii belong to novel viral genera that help to decipher intestinal viromes', *Microbiome*, 6: 65.
- Cosnes, Jacques, Laurent Beaugerie, Franck Carbonnel, and Jean-Pierre Gendre. 2001. 'Smoking cessation and the course of Crohn's disease: An intervention study', *Gastroenterology*, 120: 1093-99.
- Cosnes, Jacques, Corinne Gower, AiRousseau, Philippe Seksik, and Antoine Cortot. 2011. 'Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases', *Gastroenterology*, 140: 1785-94.e4.
- Cunliffe, R N, F R A J Rose, J Keyte, L Abberley, W C Chan, and Y R Mahida. 2001. 'Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease', *Gut*, 48: 176-85.
- Damms-Machado, A., S. Louis, A. Schnitzer, V. Volynets, A. Rings, M. Basrai, and S. C. Bischoff. 2017. 'Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction', *Am J Clin Nutr*, 105: 127-35.
- Darfeuille-Michaud, Arlette, Jérôme Boudeau, Philippe Bulois, Christel Neut, Anne-Lise Glasser, Nicolas Bamich, . . . Jean-Frédéric Colombel. 2004. 'High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease', *Gastroenterology*, 127: 412-21.
- Darwich, A. S., U. Aslam, D. M. Ashcroft, and A. Rostami-Hodjegan. 2014. 'Meta-analysis of the turnover of intestinal epithelia in preclinical animal species and humans', *Drug Metab Dispos*, 42: 2016-22.
- Davies, David G., Matthew R. Parsek, James P. Pearson, Barbara H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg. 1998. 'The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm', *Science*, 280: 295-98.
- Davis, Benjamin Michael, Rasmus Jensen, Paul Williams, and Paul O'Shea. 2010. 'The interaction of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signaling molecules with biological membranes: implications for inter-kingdom signaling', *PLoS one*, 5.
- De Hertogh, Gert, Jeroen Aerssens, Karen P. Geboes, and Karel Geboes. 2008. 'Evidence for the involvement of infectious agents in the pathogenesis of Crohn's disease', *World journal of gastroenterology*, 14: 845-52.
- Defoirdt, Tom. 2018. 'Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy', *Trends in Microbiology*, 26: 313-28.
- Delgado, M. E., T. Grabinger, and T. Brunner. 2016. 'Cell death at the intestinal epithelial front line', *FEBS J*, 283: 2701-19.
- Desai, M. S., A. M. Seekatz, N. M. Koropatkin, N. Kamada, C. A. Hickey, M. Wolter, . . . E. C. Martens. 2016. 'A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility', *Cell*.

- Diggle, Stephen P., Sandra Matthijs, Victoria J. Wright, Matthew P. Fletcher, Siri Ram Chhabra, Iain L. Lamont, . . . Paul Williams. 2007. 'The Pseudomonas aeruginosa 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment', *Chemistry & Biology*, 14: 87-96.
- Diggle, Stephen P., Klaus Winzer, Siri Ram Chhabra, Kathryn E. Worrall, Miguel Cámara, and Paul Williams. 2003. 'The Pseudomonas aeruginosa quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR', *Molecular Microbiology*, 50: 29-43.
- Donaldson, G. P., S. M. Lee, and S. K. Mazmanian. 2016. 'Gut biogeography of the bacterial microbiota', *Nat Rev Microbiol*, 14: 20-32.
- Dorfel, M. J., Christian Westphal Jk Fau - Bellmann, Susanne M. Bellmann C Fau - Krug, Jimmi Krug Sm Fau - Cording, Sonnhild Cording J Fau - Mittag, Rudolf Mittag S Fau - Tauber, . . . O. Huber. 2013. 'CK2-dependent phosphorylation of occludin regulates the interaction with ZO-proteins and tight junction integrity', *Cell Communication and Signalling*.
- Dörfel, Max J, and Otmar Huber. 2012. 'A phosphorylation hotspot within the occludin C-terminal domain', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1257: 38-44.
- Du, Yi-Ling, Xue-Ling Shen, Pin Yu, Lin-Quan Bai, and Yong-Quan Li. 2011. 'Gamma-butyrolactone regulatory system of Streptomyces chattanoogensis links nutrient utilization, metabolism, and development', *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 8415-26.
- Duboc, H., S. Rajca, D. Rainteau, D. Benarous, M. A. Maubert, E. Quervain, . . . P. Seksik. 2013. 'Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases', *Gut*, 62: 531-9.
- Dubuquoy, L., E. A. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J. F. Colombel, . . . P. Desreumaux. 2003. 'Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis', *Gastroenterology*, 124: 1265-76.
- Dunlop, Simon P, John Hebden, Eugene Campbell, Jorgen Naesdal, Lars Olbe, Alan C Perkins, and Robin C Spiller. 2006. 'Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes', *The American journal of gastroenterology*, 101: 1288.
- Eckburg, Paul B., Elisabeth M. Bik, Charles N. Bernstein, Elizabeth Purdom, Les Dethlefsen, Michael Sargent, . . . David A. Relman. 2005. 'Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora', *Science*, 308: 1635-38.
- Engbrecht, JoAnne, and Michael Silverman. 1984. 'Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 4154-58.
- Erickson, D. L., R. Endersby, A. Kirkham, K. Stuber, D. D. Vollman, H. R. Rabin, . . . D. G. Storey. 2002. 'Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis', *Infect Immun*, 70: 1783-90.
- Estepa, V., B. Rojo-Bezares, C. Torres, and Y. Saenz. 2014. 'Faecal carriage of Pseudomonas aeruginosa in healthy humans: antimicrobial susceptibility and global genetic lineages', *FEMS Microbiol Ecol*, 89: 15-9.
- Eum, S. Y., D. Jaraki, L. Bertrand, I. E. Andras, and M. Toborek. 2014. 'Disruption of epithelial barrier by quorum-sensing N-3-(oxododecanoyl)-homoserine lactone is mediated by matrix metalloproteinases', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 306: G992-G1001.
- Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, . . . C. M. Rice. 2007. 'Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry', *Nature*, 446: 801-5.
- Ewaschuk, Julia B., Hugo Diaz, Liisa Meddings, Brendan Diederichs, Andrea Dmytrash, Jody Backer, . . . Karen L. Madsen. 2008. 'Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295: G1025-G34.
- Farin, H. F., W. R. Karthaus, P. Kujala, M. Rakhshandehroo, G. Schwank, R. G. Vries, . . . H. Clevers. 2014. 'Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma', *J Exp Med*, 211: 1393-405.

- Farshori, P., and B. Kachar. 1999. 'Redistribution and Phosphorylation of Occludin During Opening and Resealing of Tight Junctions in Cultured Epithelial Cells', *The Journal of Membrane Biology*, 170: 147-56.
- Fasano, A, B Baudry, D W Pumphlin, S S Wasserman, B D Tall, J M Ketley, and J B Kaper. 1991. 'Vibrio cholerae produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 5242-46.
- Faure, E., K. Kwong, and D. Nguyen. 2018. 'Pseudomonas aeruginosa in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host?', *Front Immunol*, 9: 2416.
- Feng, W., Y. Wu, G. Chen, S. Fu, B. Li, B. Huang, . . . J. Liu. 2018. 'Sodium Butyrate Attenuates Diarrhea in Weaned Piglets and Promotes Tight Junction Protein Expression in Colon in a GPR109A-Dependent Manner', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47: 1617-29.
- Fletcher, S. J., N. S. Poulter, E. J. Haining, and J. Z. Rappoport. 2012. 'Clathrin-mediated endocytosis regulates occludin, and not focal adhesion, distribution during epithelial wound healing', *Biol Cell*, 104: 238-56.
- Foot, N., T. Henshall, and S. Kumar. 2017. 'Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins', *Physiol Rev*, 97: 253-81.
- Forbes, Jessica D., Chih-yu Chen, Natalie C. Knox, Ruth-Ann Marrie, Hani El-Gabalawy, Teresa de Kievit, . . . Gary Van Domselaar. 2018. 'A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases—does a common dysbiosis exist?', *Microbiome*, 6: 221.
- Fouquet, S., V. H. Lugo-Martinez, A. M. Faussat, F. Renaud, P. Cardot, J. Chambaz, . . . S. Thenet. 2004. 'Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes', *J Biol Chem*, 279: 43061-9.
- Frank, Daniel N., Allison L. St. Amand, Robert A. Feldman, Edgar C. Boedeker, Noam Harpaz, and Norman R. Pace. 2007. 'Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 13780-85.
- Franke, A., D. P. McGovern, J. C. Barrett, K. Wang, G. L. Radford-Smith, T. Ahmad, . . . M. Parkes. 2010. 'Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci', *Nat Genet*, 42: 1118-25.
- Fries, Walter, Maria C. Renda, Maria A. Lo Presti, Antonella Raso, Ambrogio Orlando, Lorenzo Oliva, . . . Mario Cottone. 2005. 'Intestinal Permeability and Genetic Determinants in Patients, First-Degree Relatives, and Controls in a High-Incidence Area of Crohn's Disease in Southern Italy', *American Journal of Gastroenterology*, 100: 2730-36.
- Fujita, Yasuyuki, Gerd Krause, Martin Scheffner, Dietmar Zechner, Hugo E. Molina Leddy, Jürgen Behrens, . . . Walter Birchmeier. 2002. 'Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex', *Nature Cell Biology*, 4: 222.
- Fukumatsu, M., M. Ogawa, S. Arakawa, M. Suzuki, K. Nakayama, S. Shimizu, . . . C. Sasakawa. 2012. 'Shigella targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells', *Cell Host Microbe*, 11: 325-36.
- Furlong, C. E., J. Marsillach, G. P. Jarvik, and L. G. Costa. 2016. 'Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions?', *Chem Biol Interact*, 259: 51-62.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. 'Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions', *J Cell Biol*, 123: 1777-88.
- Furuse, M., Y. Izumi, Y. Oda, T. Higashi, and N. Iwamoto. 2014. 'Molecular organization of tricellular tight junctions', *Tissue Barriers*, 2: e28960.
- Furuse, Mikio. 2010. 'Molecular basis of the core structure of tight junctions', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2: a002907.
- Gagliardi, P. A., and L. Primo. 2019. 'Death for life: a path from apoptotic signaling to tissue-scale effects of apoptotic epithelial extrusion', *Cell Mol Life Sci*, 76: 3571-81.
- Gaida, Matthias Martin, Ulrike Dapunt, and Gertrud Maria Hänsch. 2016. 'Sensing developing biofilms: the bitter receptor T2R38 on myeloid cells', *Pathogens and disease*, 74.
- Gallagher, Larry A., Susan L. McKnight, Marina S. Kuznetsova, Everett C. Pesci, and Colin Manoil. 2002. 'Functions Required for Extracellular Quinolone Signaling by Pseudomonas aeruginosa', *Journal of bacteriology*, 184: 6472-80.

- Galloway, W. R., J. T. Hodgkinson, S. D. Bowden, M. Welch, and D. R. Spring. 2011. 'Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways', *Chem Rev*, 111: 28-67.
- Gambello, M J, and B H Iglewski. 1991. 'Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression', *Journal of bacteriology*, 173: 3000-09.
- Gambello, M J, S Kaye, and B H Iglewski. 1993. 'LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression', *Infection and Immunity*, 61: 1180-84.
- Ganeshan, K., and A. Chawla. 2014. 'Metabolic regulation of immune responses', *Annu Rev Immunol*, 32: 609-34.
- Garcia-Hernandez, Vicky, Miguel Quiros, and Asma Nusrat. 2017. 'Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1397: 66-79.
- Genser, L., D. Aguanno, H. A. Soula, L. Dong, L. Trystram, K. Assmann, . . . C. Poitou. 2018. 'Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes', *J Pathol*, 246: 217-30.
- Gevers, D., S. Kugathasan, L. A. Denson, Y. Vazquez-Baeza, W. Van Treuren, B. Ren, . . . R. J. Xavier. 2014. 'The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease', *Cell Host Microbe*, 15: 382-92.
- Ghezzal, S., B. G. Postal, E. Quevrain, L. Brot, P. Seksik, A. Leturque, . . . V. Carriere. 2019. 'Palmitic acid damages gut epithelium integrity and initiates inflammatory cytokine production', *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*: 158530.
- Gibson, Ronald L, Jane L Burns, and Bonnie W Ramsey. 2003. 'Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis', *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168: 918-51.
- Gitter, ALFRED H., KERSTIN BENDFELDT, JÖRG-DIETER SCHULZKE, and MICHAEL FROMM. 2000. 'Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF- α -induced single-cell apoptosis', *The FASEB Journal*, 14: 1749-53.
- Gitter, Alfred H., Friederike Wullstein, Michael Fromm, and Jörg Dieter Schulzke. 2001. 'Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: Characterization and quantification by electrophysiological imaging', *Gastroenterology*, 121: 1320-28.
- Glucksam-Galnoy, Y., R. Sananes, N. Silberstein, P. Krief, V. V. Kravchenko, M. M. Meijler, and T. Zor. 2013. 'The bacterial quorum-sensing signal molecule N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone reciprocally modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in activated macrophages', *J Immunol*, 191: 337-44.
- Golovkine, G., E. Faudry, S. Bouillot, S. Elsen, I. Attree, and P. Huber. 2016. '*Pseudomonas aeruginosa* Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion', *PLoS Pathog*, 12: e1005377.
- Golovkine, G., E. Reboud, and P. Huber. 2017. '*Pseudomonas aeruginosa* Takes a Multi-Target Approach to Achieve Junction Breach', *Front Cell Infect Microbiol*, 7: 532.
- Gonzalez-Mariscal, L., R. Tapia, and D. Chamorro. 2008. 'Crosstalk of tight junction components with signaling pathways', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 729-56.
- González-Mariscal, Lorenza, Alaide Domínguez-Calderón, Arturo Raya-Sandino, José Mario Ortega-Olvera, Orlando Vargas-Sierra, and Gabriela Martínez-Revollar. 2014. 'Tight junctions and the regulation of gene expression', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36: 213-23.
- Gradel, Kim O., Hans L. Nielsen, Henrik C. Schönheyder, Tove Ejlersen, Brian Kristensen, and Henrik Nielsen. 2009. 'Increased Short- and Long-Term Risk of Inflammatory Bowel Disease After Salmonella or Campylobacter Gastroenteritis', *Gastroenterology*, 137: 495-501.
- Graham, W. V., W. He, A. M. Marchiando, J. Zha, G. Singh, H. S. Li, . . . J. R. Turner. 2019. 'Intracellular MLCK1 diversion reverses barrier loss to restore mucosal homeostasis', *Nat Med*, 25: 690-700.
- Green, K. J., A. Jaiganesh, and J. A. Broussard. 2019. 'Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network', *F1000Res*, 8.

- Groschwitz, Katherine R, David Wu, Heather Osterfeld, Richard Ahrens, and Simon P Hogan. 2013. 'Chymase-mediated intestinal epithelial permeability is regulated by a protease-activating receptor/matrix metalloproteinase-2-dependent mechanism', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304: G479.
- Gross, A., L. A. P. Pack, G. M. Schacht, S. Kant, H. Ungewiss, M. Meir, . . . P. Strnad. 2018. 'Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury', *Mucosal Immunol*, 11: 1630-39.
- Guerville, M., A. Leroy, A. Sinquin, F. Laugerette, M. C. Michalski, and G. Boudry. 2017. 'Western-diet consumption induces alteration of barrier function mechanisms in the ileum that correlates with metabolic endotoxemia in rats', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 313: E107-E20.
- Guo, Jiajie, Kaya Yoshida, Mika Ikegame, and Hirohiko Okamura. 2020. 'Quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone: An all-rounder in mammalian cell modification', *Journal of Oral Biosciences*.
- Gutierrez-Vazquez, C., and F. J. Quintana. 2018. 'Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor', *Immunity*, 48: 19-33.
- Halldorsson, Skarphedinn, Thorarinn Gudjonsson, Magnus Gottfredsson, Pradeep K Singh, Gudmundur Hrafn Gudmundsson, and Olafur Baldursson. 2010. 'Azithromycin maintains airway epithelial integrity during *Pseudomonas aeruginosa* infection', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 42: 62-68.
- Hamilton, M. K., G. Boudry, D. G. Lemay, and H. E. Raybould. 2015. 'Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 308: G840-51.
- Hammer, Brian K, and Bonnie L Bassler. 2003. 'Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*', *Molecular Microbiology*, 50: 101-04.
- Han, Bin, Baifa Sheng, Zhicao Zhang, Aimin Pu, Jiuhe Yin, Qimeng Wang, . . . Hua Yang. 2016. 'Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Intestinal Obstruction Ameliorates Intestinal Barrier Dysfunction Via Suppression of MLCK-MLC Phosphorylation Pathway', *Shock*, 46.
- Hansson, G. C. 2019. 'Mucus and mucins in diseases of the intestinal and respiratory tracts', *J Intern Med*, 285: 479-90.
- Hayes, C. L., J. Dong, H. J. Galipeau, J. Jury, J. McCarville, X. Huang, . . . E. F. Verdu. 2018. 'Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis', *Sci Rep*, 8: 14184.
- He, Wei-Qi, Jing Wang, Jian-Ying Sheng, Juan-Min Zha, W. Vallen Graham, and Jerrold R. Turner. 2020. 'Contributions of Myosin Light Chain Kinase to Regulation of Epithelial Paracellular Permeability and Mucosal Homeostasis', *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 993.
- Hedman, A. C., J. M. Smith, and D. B. Sacks. 2015. 'The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton', *EMBO Rep*, 16: 427-46.
- Helander, H. F., and L. Fandriks. 2014. 'Surface area of the digestive tract - revisited', *Scand J Gastroenterol*, 49: 681-9.
- Heller, F., P. Florian, C. Bojarski, J. Richter, M. Christ, B. Hillenbrand, . . . J. D. Schulzke. 2005. 'Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution', *Gastroenterology*, 129: 550-64.
- Higashi, T., and A. L. Miller. 2017. 'Tricellular junctions: how to build junctions at the TRICkiest points of epithelial cells', *Mol Biol Cell*, 28: 2023-34.
- Higashi, T., Shin-ichiro Tokuda S Fau - Kitajiri, Sayuri Kitajiri S Fau - Masuda, Hiroki Masuda S Fau - Nakamura, Yukako Nakamura H Fau - Oda, Mikio Oda Y Fau - Furuse, and M. Furuse. 2013. 'Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis', *J Cell Sci*.
- Hoarau, G., P. K. Mukherjee, C. Gower-Rousseau, C. Hager, J. Chandra, M. A. Retuerto, . . . M. A. Ghannoum. 2016. 'Bacteriome and Mycobioime Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease', *mBio*, 7: e01250-16.
- Holban, Alina-Maria, Coralia Bleotu, Mariana Carmen Chifiriuc, Eugenia Bezirtzoglou, and Veronica Lazar. 2014. 'Role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing (QS) molecules on the viability and cytokine profile of human mesenchymal stem cells', *Virulence*, 5: 303-10.

- Hollander, D., C. M. Vadheim, E. Brettholz, G. M. Petersen, T. Delahunty, and J. I. Rotter. 1986. 'Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor', *Ann Intern Med*, 105: 883-5.
- Holm, A., and E. Vikstrom. 2014. 'Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions', *Front Plant Sci*, 5: 309.
- Hooi, Doreen SW, Barrie W Bycroft, Siri Ram Chhabra, Paul Williams, and David I Pritchard. 2004. 'Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules', *Infection and Immunity*, 72: 6463-70.
- Hooper, L. V. 2015. 'Epithelial cell contributions to intestinal immunity', *Adv Immunol*, 126: 129-72.
- Horke, Sven, Junhui Xiao, Eva-Maria Schütz, Gerald L. Kramer, Petra Wilgenbus, Ines Witte, . . . John F. Teiber. 2015. 'Novel Paraoxonase 2-Dependent Mechanism Mediating the Biological Effects of the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule *N*-(3-Oxo-Dodecanoyl)-Homoserine Lactone', *Infection and Immunity*, 83: 3369-80.
- Hou, Jason K, Bincy Abraham, and Hashem El-Serag. 2011. 'Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature', *American Journal of Gastroenterology*, 106: 563-73.
- Huang, Wen, Sung Yong Eum, Ibolya E András, Bernhard Hennig, and Michal Toborek. 2009. 'PPAR α and PPAR γ attenuate HIV-induced dysregulation of tight junction proteins by modulations of matrix metalloproteinase and proteasome activities', *The FASEB Journal*, 23: 1596-606.
- Huber, P. 2020. 'Targeting of the apical junctional complex by bacterial pathogens', *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862: 183237.
- Hughes, David T., Darya A. Terekhova, Linda Liou, Carolyn J. Hovde, Jason W. Sahl, Arati V. Patankar, . . . Vanessa Sperandio. 2010. 'Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 9831-36.
- Human Microbiome Project, Consortium. 2012. 'Structure, function and diversity of the healthy human microbiome', *Nature*, 486: 207-14.
- Iacob, S., D. G. Iacob, and L. M. Luminos. 2018. 'Intestinal Microbiota as a Host Defense Mechanism to Infectious Threats', *Front Microbiol*, 9: 3328.
- Ikenouchi, J., M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, S. Tsukita, and S. Tsukita. 2005. 'Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells', *J Cell Biol*, 171: 939-45.
- Ikenouchi, J., H. Sasaki, S. Tsukita, M. Furuse, and S. Tsukita. 2008. 'Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin', *Mol Biol Cell*, 19: 4687-93.
- Ismail, A. S., J. S. Valastyan, and B. L. Bassler. 2016. 'A Host-Produced Autoinducer-2 Mimic Activates Bacterial Quorum Sensing', *Cell Host Microbe*, 19: 470-80.
- Ivanov, A. I., S. N. Samarin, M. Bachar, C. A. Parkos, and A. Nusrat. 2009. 'Protein kinase C activation disrupts epithelial apical junctions via ROCK-II dependent stimulation of actomyosin contractility', *BMC Cell Biol*, 10: 36.
- Ivanov, Andrei I., Asma Nusrat, and Charles A. Parkos. 2004. 'Endocytosis of Epithelial Apical Junctional Proteins by a Clathrin-mediated Pathway into a Unique Storage Compartment', *Molecular biology of the cell*, 15: 176-88.
- Ivanov, Andrei I., Charles A. Parkos, and Asma Nusrat. 2010. 'Cytoskeletal Regulation of Epithelial Barrier Function During Inflammation', *The American Journal of Pathology*, 177: 512-24.
- Jahoor, Aruna, Rashila Patel, Amanda Bryan, Catherine Do, Jay Krier, Chase Watters, . . . Kendra P Rumbaugh. 2008. 'Peroxisome proliferator-activated receptors mediate host cell proinflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer', *Journal of bacteriology*, 190: 4408-15.
- Janke, S., S. Mittag, J. Reiche, and O. Huber. 2019. 'Apoptotic Fragmentation of Tricellulin', *Int J Mol Sci*, 20.
- Jansson, Janet, Ben Willing, Marianna Lucio, Ages Fekete, Johan Dicksved, Jonas Halfvarson, . . . Philippe Schmitt-Kopplin. 2009. 'Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease', *PloS one*, 4: e6386-e86.
- Jennek, S., S. Mittag, J. Reiche, J. K. Westphal, S. Seelk, M. J. Dorfel, . . . O. Huber. 2017. 'Tricellulin is a target of the ubiquitin ligase Itch', *Ann NY Acad Sci*, 1397: 157-68.

- Jiminez, Janelle A., Trina C. Uwiera, G. Douglas Inglis, and Richard R. E. Uwiera. 2015. 'Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals', *Gut Pathogens*, 7: 29.
- Johansson, J. E., and T. Ekman. 2007. 'Gut toxicity during hemopoietic stem cell transplantation may predict acute graft-versus-host disease severity in patients', *Dig Dis Sci*, 52: 2340-5.
- Johansson, M. E., J. K. Gustafsson, J. Holmen-Larsson, K. S. Jabbar, L. Xia, H. Xu, . . . G. C. Hansson. 2014. 'Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis', *Gut*, 63: 281-91.
- Johansson, M. E., H. E. Jakobsson, J. Holmen-Larsson, A. Schutte, A. Ermund, A. M. Rodriguez-Pineiro, . . . G. C. Hansson. 2015. 'Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization', *Cell Host Microbe*, 18: 582-92.
- Jostins, Luke, Stephan Ripke, Rinse K. Weersma, Richard H. Duerr, Dermot P. McGovern, Ken Y. Hui, . . . Judy H. Cho. 2012. 'Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease', *Nature*, 491: 119-24.
- Jung, C., J. P. Hugot, and F. Barreau. 2010. 'Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine', *Int J Inflam*, 2010: 823710.
- Junqueira, Luis C, and Anthony L Mescher. 13th Edition. *Junqueira's basic histology: text & atlas/Anthony L. Mescher* (New York [etc.]: McGraw-Hill Medical).
- Junqueira, Luis C, and Anthony L Mescher. 15th Edition. *Junqueira's basic histology: text & atlas/Anthony L. Mescher* (New York [etc.]: McGraw-Hill Medical).
- Kandori, Hitoshi, Kazuhiro Hirayama, Makio Takeda, and Kunio Doi. 1996. 'Histochemical, Lectin-Histochemical and Morphometrical Characteristics of Intestinal Goblet Cells of Germfree and Conventional Mice', *Experimental Animals*, 45: 155-60.
- Kaper, J. B., and V. Sperandio. 2005. 'Bacterial Cell-to-Cell Signaling in the Gastrointestinal Tract', *Infection and Immunity*, 73: 3197-209.
- Kaper, James B., James P. Nataro, and Harry L. T. Mobley. 2004. 'Pathogenic Escherichia coli', *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123-40.
- Kaplan, G. G. 2015. 'The global burden of IBD: from 2015 to 2025', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12: 720-7.
- Kaplan, Gilaad G., Timothy Jackson, Bruce E. Sands, Morten Frisch, Roland E. Andersson, and Joshua Korzenik. 2008. 'The Risk of Developing Crohn's Disease After an Appendectomy: A Meta-Analysis', *American Journal of Gastroenterology*, 103: 2925-31.
- Karayannakis, A. J., K. N. Syrigos, J. Efstathiou, A. Valizadeh, M. Noda, R. J. Playford, . . . M. Pignatelli. 1998. 'Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease', *J Pathol*, 185: 413-8.
- Karlsson, T., Karl-Eric Musse F Fau - Magnusson, Elena Magnusson Ke Fau - Vikstrom, and E. Vikstrom. 2012a. 'N-Acylhomoserine lactones are potent neutrophil chemoattractants that act via calcium mobilization and actin remodeling', *The Journal of Leukocyte*.
- Karlsson, T., Olena Turkina Mv Fau - Yakymenko, Karl-Eric Yakymenko O Fau - Magnusson, Elena Magnusson Ke Fau - Vikstrom, and E. Vikstrom. 2012b. 'The Pseudomonas aeruginosa N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration', *PLoS Pathog*.
- Kartenbeck, J., M. Schmelz, W. W. Franke, and B. Geiger. 1991. 'Endocytosis of junctional cadherins in bovine kidney epithelial (MDBK) cells cultured in low Ca²⁺ ion medium', *J Cell Biol*, 113: 881-92.
- Katsuno, Tatsuya, Kazuaki Umeda, Takeshi Matsui, Masaki Hata, Atsushi Tamura, Masahiko Itoh, . . . Tetsuo Noda. 2008. 'Deficiency of ZO-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells', *Mol. Biol. Cell*.
- Keeney, K. M., S. Yurist-Doutsch, M. C. Arrieta, and B. B. Finlay. 2014. 'Effects of antibiotics on human microbiota and subsequent disease', *Annu Rev Microbiol*, 68: 217-35.
- Keita, A. V., C. M. Lindqvist, A. Ost, C. D. L. Magana, I. Schoultz, and J. Halfvarson. 2018. 'Gut Barrier Dysfunction-A Primary Defect in Twins with Crohn's Disease Predominantly Caused by Genetic Predisposition', *J Crohns Colitis*, 12: 1200-09.
- Kerckhoffs, A. P. M., K. Ben-Amor, M. Samsom, M. E. van der Rest, J. de Vogel, J. Knol, and L. M. A. Akkermans. 2011. 'Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly

- higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome', *J Med Microbiol*, 60: 236-45.
- Kessler, Efrat, Mary Safrin, Joan C Olson, and Dennis E Ohman. 1993. 'Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease', *Journal of Biological Chemistry*, 268: 7503-08.
- Khor, B., A. Gardet, and R. J. Xavier. 2011. 'Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease', *Nature*, 474: 307-17.
- Kim, Chung Sub, Alexandra Gatsios, Santiago Cuesta, Yick Chong Lam, Zheng Wei, Haiwei Chen, . . . Jason M. Crawford. 2020. 'Characterization of Autoinducer-3 Structure and Biosynthesis in *E. coli*', *ACS Central Science*.
- Kim, Junghyun, Chan-Sik Kim, Yun Mi Lee, Kyuhyung Jo, So Dam Shin, and Jin Sook Kim. 2012. 'Methylglyoxal induces hyperpermeability of the blood-retinal barrier via the loss of tight junction proteins and the activation of matrix metalloproteinases', *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 250: 691-97.
- Knösel, Thomas, Christiane Schewe, Nanni Petersen, Manfred Dietel, and Iver Petersen. 2009. 'Prevalence of infectious pathogens in Crohn's disease', *Pathology - Research and Practice*, 205: 223-30.
- Knox, N. C., J. D. Forbes, C. L. Peterson, G. Van Domselaar, and C. N. Bernstein. 2019. 'The Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Lessons Learned From Other Immune-Mediated Inflammatory Diseases', *Am J Gastroenterol*, 114: 1051-70.
- Koh, A., F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, and F. Backhed. 2016. 'From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites', *Cell*, 165: 1332-45.
- Kohler, H., T. Sakaguchi, B. P. Hurley, B. A. Kase, H. C. Reinecker, and B. A. McCormick. 2007. 'Salmonella enterica serovar Typhimurium regulates intercellular junction proteins and facilitates transepithelial neutrophil and bacterial passage', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293: G178-87.
- Kostic, A. D., R. J. Xavier, and D. Gevers. 2014. 'The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead', *Gastroenterology*.
- Kozakova, H., M. Schwarzer, L. Tuckova, D. Srutkova, E. Czarnowska, I. Rosiak, . . . B. Cukrowska. 2016. 'Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization', *Cell Mol Immunol*, 13: 251-62.
- Kravchenko, V. V., G. F. Kaufmann, J. C. Mathison, D. A. Scott, A. Z. Katz, D. C. Grauer, . . . R. J. Ulevitch. 2008. 'Modulation of gene expression via disruption of NF-kappaB signaling by a bacterial small molecule', *Science*, 321: 259-63.
- Kravchenko, V. V., G. F. Kaufmann, J. C. Mathison, D. A. Scott, A. Z. Katz, M. R. Wood, . . . R. J. Ulevitch. 2006. 'N-(3-oxo-acyl)homoserine lactones signal cell activation through a mechanism distinct from the canonical pathogen-associated molecular pattern recognition receptor pathways', *J Biol Chem*, 281: 28822-30.
- Krug, S. M., C. Bojarski, A. Fromm, I. M. Lee, P. Dames, J. F. Richter, . . . J. D. Schulzke. 2018. 'Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor alpha2, affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis', *Mucosal Immunol*, 11: 345-56.
- Krug, S. M., J. D. Schulzke, and M. Fromm. 2014. 'Tight junction, selective permeability, and related diseases', *Semin Cell Dev Biol*, 36: 166-76.
- Krug, Susanne M., Salah Amasheh, Jan F. Richter, Susanne Milatz, Dorothee Günzel, Julie K. Westphal, . . . Michael Fromm. 2009. 'Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability', *Molecular biology of the cell*, 20: 3713-24.
- Kumar, S. R., J. N. Bryan, A. M. Eaton, K. L. Robinson, and S. Gajagowni. 2018. 'Differential Modulation of Transcription Factors and Cytoskeletal Proteins in Prostate Carcinoma Cells by a Bacterial Lactone', *Biomed Res Int*, 2018: 6430504.
- Kumari, Anjali, Patrizia Pasini, Sapna K Deo, Deborah Flomenhoft, Harohalli Shashidhar, and Sylvia Daunert. 2006. 'Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules', *Analytical chemistry*, 78: 7603-09.
- Lamas, B., J. M. Natividad, and H. Sokol. 2018. 'Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity', *Mucosal Immunol*, 11: 1024-38.

- Lamas, B., M. L. Richard, V. Leducq, H. P. Pham, M. L. Michel, G. Da Costa, . . . H. Sokol. 2016. 'CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands', *Nat Med*, 22: 598-605.
- Lamps, Laura W., K. T. Madhusudhan, Jennifer M. Havens, Joel K. Greenson, Mary P. Bronner, Melissa C. Chiles, . . . Margie A. Scott. 2003. 'Pathogenic *Yersinia* DNA Is Detected in Bowel and Mesenteric Lymph Nodes From Patients With Crohn's Disease', *The American Journal of Surgical Pathology*, 27: 220-27.
- Landman, C., J. P. Grill, J. M. Mallet, P. Marteau, L. Humbert, E. Le Balc'h, . . . I. B. D. Network Saint Antoine. 2018. 'Inter-kingdom effect on epithelial cells of the N-Acyl homoserine lactone 3-oxo-C12:2, a major quorum-sensing molecule from gut microbiota', *PloS one*, 13: e0202587.
- Larsson, J. M., H. Karlsson, J. G. Crespo, M. E. Johansson, L. Eklund, H. Sjoval, and G. C. Hansson. 2011. 'Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation', *Inflamm Bowel Dis*, 17: 2299-307.
- Laukoetter, M. G., P. Nava, W. Y. Lee, E. A. Severson, C. T. Capaldo, B. A. Babbitt, . . . C. A. Parkos. 2007. 'JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo', *J Exp Med*, 204: 3067-76.
- Laval, L., R. Martin, J. N. Natividad, F. Chain, S. Miquel, C. Desclee de Maredsous, . . . P. Langella. 2015a. 'Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690 and the commensal bacterium Faecalibacterium prausnitzii A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice', *Gut Microbes*, 6: 1-9.
- Laval, L., R. Martin, J. N. Natividad, F. Chain, S. Miquel, C. Desclee de Maredsous, . . . P. Langella. 2015b. 'Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690 and the commensal bacterium Faecalibacterium prausnitzii A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice', *Gut Microbes*, 6: 1-9.
- Lavelle, A, G Lennon, O O'Sullivan, N Docherty, A Balfe, A Maguire, . . . P R O'Connell. 2015. 'Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers', *Gut*, 64: 1553-61.
- Lavelle, Aonghus, and Harry Sokol. 2020. 'Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.
- Le Gall, M., S. Thenet, D. Aguanno, A. C. Jarry, L. Genser, L. Ribeiro-Parenti, . . . J. Le Beyec. 2018. 'Intestinal plasticity in response to nutrition and gastrointestinal surgery', *Nutr Rev*.
- Lechuga, Susana, and Andrei I. Ivanov. 2017. 'Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864: 1183-94.
- Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, . . . P. Cossart. 2001. 'A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier', *Science*, 292: 1722-5.
- Lecuit, Marc, Shaynoor Dramsi, Cara Gottardi, Mary Fedor-Chaiken, Barry Gumbiner, and Pascale Cossart. 1999. 'A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*', *The EMBO Journal*, 18: 3956-63.
- Lee, J., C. Attila, S. L. Cirillo, J. D. Cirillo, and T. K. Wood. 2009. 'Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence', *Microb Biotechnol*, 2: 75-90.
- Lee, Jasmine, Jien Wu, Yinyue Deng, Jing Wang, Chao Wang, Jianhe Wang, . . . Lian-Hui Zhang. 2013. 'A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response', *Nature Chemical Biology*, 9: 339-43.
- Lee, Jasmine, and Lianhui Zhang. 2015. 'The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*', *Protein & Cell*, 6: 26-41.
- Lee, Jintae, Arul Jayaraman, and Thomas K Wood. 2007. 'Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA', *BMC microbiology*, 7: 42.
- Lerner, Aaron, and Torsten Matthias. 2015. 'Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease', *Autoimmunity Reviews*, 14: 479-89.
- Levy, Emile, Karine Trudel, Moise Bendayan, Ernest Seidman, Edgard Delvin, Mounib Elchebly, . . . Daniel Sinnett. 2007. 'Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative

- stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293: G1252.
- Li, Bei, Yuling Zhao, Changting Liu, Zhenhong Chen, and Dongsheng Zhou. 2014. 'Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*', *Future microbiology*, 9: 1071-81.
- Li, Z., G. Quan, X. Jiang, Y. Yang, X. Ding, D. Zhang, . . . G. Zhu. 2018. 'Effects of Metabolites Derived From Gut Microbiota and Hosts on Pathogens', *Front Cell Infect Microbiol*, 8: 314.
- Liu, J. Z., S. van Sommeren, H. Huang, S. C. Ng, R. Alberts, A. Takahashi, . . . R. K. Weersma. 2015a. 'Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations', *Nat Genet*, 47: 979-86.
- Liu, S., W. Yang, L. Shen, J. R. Turner, C. B. Coyne, and T. Wang. 2009. 'Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection', *J Virol*, 83: 2011-4.
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, and Shao-Cong Sun. 2017. 'NF- κ B signaling in inflammation', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2: 17023.
- Liu, Xiaochang, Jianming Xu, Qiao Mei, Liang Han, and Jian Huang. 2013. 'Myosin Light Chain Kinase Inhibitor Inhibits Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice', *Digestive Diseases and Sciences*, 58: 107-14.
- Liu, Y. C., K. G. Chan, and C. Y. Chang. 2015b. 'Modulation of Host Biology by *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Signal Molecules: Messengers or Traitors', *Front Microbiol*, 6: 1226.
- Liu, Ying, Herbert J Van Kruiningen, A Brian West, Richard W Cartun, Antoine Cortot, and Jean-Frédéric Colombel. 1995. 'Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus antigens* in Crohn's disease', *Gastroenterology*, 108: 1396-404.
- Lukáš, F, G Gorenc, and J Kopečný. 2008. 'Detection of possible AI-2-mediated quorum sensing system in commensal intestinal bacteria', *Folia microbiologica*, 53: 221-24.
- Lyte, Mark, Lucy Vulchanova, and David R. Brown. 2011. 'Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa-bacteria interactions', *Cell and Tissue Research*, 343: 23-32.
- M. Orholm, V. Binder T. I. A. Sørensen L. P. Rasmussen K. O. Kyvik. 2000. 'Concordance of Inflammatory Bowel Disease among Danish Twins: Results of a Nationwide Study', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35: 1075-81.
- Magney, J. E., S. L. Erlandsen, M. L. Bjerknes, and H. Cheng. 1986. 'Scanning electron microscopy of isolated epithelium of the murine gastrointestinal tract: morphology of the basal surface and evidence for paracrinelike cells', *Am J Anat*, 177: 43-53.
- Magnuson, Roy, Jonathan Solomon, and Alan D Grossman. 1994. 'Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*', *Cell*, 77: 207-16.
- Makki, K., E. C. Deehan, J. Walter, and F. Backhed. 2018. 'The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease', *Cell Host Microbe*, 23: 705-15.
- Mallow, E. B., A. Harris, N. Salzman, J. P. Russell, R. J. DeBerardinis, E. Ruchelli, and C. L. Bevins. 1996. 'Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression', *J Biol Chem*, 271: 4038-45.
- Man, Si Ming, Li Zhang, Andrew S. Day, Steven T. Leach, Daniel A. Lemberg, and Hazel Mitchell. 2009. 'Campylobacter concisus and other Campylobacter species in children with newly diagnosed Crohn's disease', *Inflammatory bowel diseases*, 16: 1008-16.
- Manfredi, Roberto, Leonardo Calza, and Francesco Chiodo. 2002. 'Epidemiology and microbiology of cellulitis and bacterial soft tissue infection during HIV disease: a 10-year survey', *Journal of cutaneous pathology*, 29: 168-72.
- Mankertz, J., M. Amasheh, S. M. Krug, A. Fromm, S. Amasheh, B. Hillenbrand, . . . J. D. Schulzke. 2009. 'TNF α up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling', *Cell Tissue Res*, 336: 67-77.
- Manrique, P., B. Bolduc, S. T. Walk, J. van der Oost, W. M. de Vos, and M. J. Young. 2016. 'Healthy human gut phageome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 10400-5.
- Marchesi, Julian R., Elaine Holmes, Fatima Khan, Sunil Kochhar, Pauline Scanlan, Fergus Shanahan, . . . Yulan Wang. 2007. 'Rapid and Noninvasive Metabonomic Characterization of Inflammatory Bowel Disease', *Journal of Proteome Research*, 6: 546-51.
- Marchiando, A. M., W. Vallen Shen L Fau - Graham, Christopher R. Graham Wv Fau - Weber, Brad T. Weber Cr Fau - Schwarz, Jotham R. Schwarz Bt Fau - Austin, 2nd, David R. Austin Jr 2nd Fau

- Raleigh, . . . J. R. Turner. 2010. 'Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo', *JCB*.
- Marin, M. L., S. A. Geller, A. J. Greenstein, R. H. Marin, R. E. Gordon, and A. H. Aufses, Jr. 1983. 'Ultrastructural pathology of Crohn's disease: correlated transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and freeze fracture studies', *Am J Gastroenterol*, 78: 355-64.
- Martin, R., L. Laval, F. Chain, S. Miquel, J. Natividad, C. Cherbuy, . . . P. Langella. 2016. 'Bifidobacterium animalis ssp. lactis CNCM-I2494 Restores Gut Barrier Permeability in Chronically Low-Grade Inflamed Mice', *Front Microbiol*, 7: 608.
- Martin-Padura, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, . . . E. Dejana. 1998. 'Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration', *J Cell Biol*, 142: 117-27.
- Martinez, C., M. Antolin, J. Santos, A. Torrejon, F. Casellas, N. Borrueal, . . . J. R. Malagelada. 2008. 'Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission', *Am J Gastroenterol*, 103: 643-8.
- Maslowski, K. M., A. T. Vieira, A. Ng, J. Kranich, F. Sierro, D. Yu, . . . C. R. Mackay. 2009. 'Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43', *Nature*, 461: 1282-6.
- Masuda, S., Hiroyuki Oda Y Fau - Sasaki, Junichi Sasaki H Fau - Ikenouchi, Tomohito Ikenouchi J Fau - Higashi, Masaya Higashi T Fau - Akashi, Eiichiro Akashi M Fau - Nishi, . . . M. Furuse. 2011. 'LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells', *J Cell Sci*.
- Matsumoto, S., Y. Okabe, H. Setoyama, K. Takayama, J. Ohtsuka, H. Funahashi, . . . Y. Umesaki. 1998. 'Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain', *Gut*, 43: 71-8.
- Matsuoka, K., and T. Kanai. 2015. 'The gut microbiota and inflammatory bowel disease', *Semin Immunopathol*, 37: 47-55.
- Maurer, Susanne, Guido H Wabnitz, Nadine A Kahle, Sabine Stegmaier, Birgit Prior, Thomas Giese, . . . Gertrud Maria Hänsch. 2015. 'Tasting Pseudomonas aeruginosa biofilms: human neutrophils express the bitter receptor T2R38 as sensor for the quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone', *Frontiers in Immunology*, 6: 369.
- McCarthy, K. M., I. B. Skare, M. C. Stanekewich, M. Furuse, S. Tsukita, R. A. Rogers, . . . E. E. Schneeberger. 1996. 'Occludin is a functional component of the tight junction', *J Cell Sci*, 109 (Pt 9): 2287-98.
- McNeil, Elizabeth, Christopher T Capaldo, and Ian G Macara. 2006. 'Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells', *Molecular biology of the cell*, 17: 1922-32.
- Meng, W., and M. Takeichi. 2009. 'Adherens junction: molecular architecture and regulation', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a002899.
- Meyerhof, Wolfgang, Claudia Batram, Christina Kuhn, Anne Brockhoff, Elke Chudoba, Bernd Bufe, . . . Maik Behrens. 2009. 'The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors', *Chemical Senses*, 35: 157-70.
- Miao, W., X. Wu, K. Wang, W. Wang, Y. Wang, Z. Li, . . . L. Peng. 2016. 'Sodium Butyrate Promotes Reassembly of Tight Junctions in Caco-2 Monolayers Involving Inhibition of MLCK/MLC2 Pathway and Phosphorylation of PKCbeta2. LID - E1696 [pii]', *International Journal of Molecular Sciences*.
- Michael, B., J. N. Smith, S. Swift, F. Heffron, and B. M. Ahmer. 2001. 'SdiA of Salmonella enterica is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities', *J Bacteriol*, 183: 5733-42.
- Michielan, A., and R. D'Inca. 2015. 'Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut', *Mediators Inflamm*, 2015: 628157.
- Miller, Stephen T., Karina B. Xavier, Shawn R. Campagna, Michiko E. Taga, Martin F. Semmelhack, Bonnie L. Bassler, and Frederick M. Hughson. 2004. 'Salmonella typhimurium Recognizes a Chemically Distinct Form of the Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2', *Molecular Cell*, 15: 677-87.

- Mohanan, V., T. Nakata, A. N. Desch, C. Levesque, A. Boroughs, G. Guzman, . . . R. J. Xavier. 2018. 'Clorf106 is a colitis risk gene that regulates stability of epithelial adherens junctions', *Science*, 359: 1161-66.
- Mok, Kenny C., Ned S. Wingreen, and Bonnie L. Bassler. 2003. 'Vibrio harveyi quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression', *The EMBO Journal*, 22: 870-81.
- Moller, Frederik Trier, Lina Knudsen, Marcus Harbord, Jack Satsangi, Hannah Gordon, Lene Christiansen, . . . Vibeke Andersen. 2016. 'Danish cohort of monozygotic inflammatory bowel disease twins: Clinical characteristics and inflammatory activity', *World journal of gastroenterology*, 22: 5050-59.
- Monteiro-Sepulveda, M., S. Touch, C. Mendes-Sa, S. Andre, C. Poitou, O. Allatif, . . . E. Brot-Laroche. 2015. 'Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling', *Cell Metab*, 22: 113-24.
- Moré, Margret I., L. David Finger, Joel L. Stryker, Clay Fuqua, Anatol Eberhard, and Stephen C. Winans. 1996. 'Enzymatic Synthesis of a Quorum-Sensing Autoinducer Through Use of Defined Substrates', *Science*, 272: 1655-58.
- Morgan, Xochitl C., Timothy L. Tickle, Harry Sokol, Dirk Gevers, Kathryn L. Devaney, Doyle V. Ward, . . . Curtis Huttenhower. 2012. 'Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment', *Genome Biology*, 13: R79.
- Morris, Gerald P., Paul L. Beck, Margaret S. Herridge, William T. Depew, Myron R. Szewczuk, and John L. Wallace. 1989. 'Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon', *Gastroenterology*, 96: 795-803.
- Moura-Alves, P., K. Fae, E. Houthuys, A. Dorhoi, A. Kreuchwig, J. Furkert, . . . S. H. Kaufmann. 2014. 'AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence', *Nature*, 512: 387-92.
- Mowat, A. M. 2003. 'Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens', *Nat Rev Immunol*, 3: 331-41.
- Muise, A. M., T. D. Walters, W. K. Glowacka, A. M. Griffiths, B. Y. Ngan, H. Lan, . . . D. Rotin. 2009. 'Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease', *Gut*, 58: 1121-7.
- Mukherjee, Sampriiti, and Bonnie L. Bassler. 2019. 'Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments', *Nature Reviews Microbiology*, 17: 371-82.
- Munkholm, P., E. Langholz, D. Hollander, K. Thornberg, M. Orholm, K. D. Katz, and V. Binder. 1994. 'Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and their first degree relatives', *Gut*, 35: 68-72.
- Murakami, Tomoaki, Edward A. Felinski, and David A. Antonetti. 2009. 'Occludin Phosphorylation and Ubiquitination Regulate Tight Junction Trafficking and Vascular Endothelial Growth Factor-induced Permeability', *Journal of Biological Chemistry*, 284: 21036-46.
- Muto, S., M. Hata, J. Taniguchi, S. Tsuruoka, K. Moriwaki, M. Saitou, . . . M. Furuse. 2010. 'Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 8011-6.
- Muza-Moons, M. M., E. E. Schneeberger, and G. A. Hecht. 2004. 'Enteropathogenic Escherichia coli infection leads to appearance of aberrant tight junctions strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells', *Cell Microbiol*, 6: 783-93.
- Natividad, J. M., A. Agus, J. Planchais, B. Lamas, A. C. Jarry, R. Martin, . . . H. Sokol. 2018. 'Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome', *Cell Metab*, 28: 737-49 e4.
- Natividad, J. M., and E. F. Verdu. 2013. 'Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications', *Pharmacol Res*, 69: 42-51.
- Nealson, Kenneth H, Terry Platt, and J Woodland Hastings. 1970. 'Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system', *Journal of bacteriology*, 104: 313-22.
- Neely, A. M., G. Zhao, C. Schwarzer, N. S. Stivers, A. G. Whitt, S. Meng, . . . C. Li. 2017. 'N-(3-Oxo-acyl)-homoserine lactone induces apoptosis primarily through a mitochondrial pathway in fibroblasts', *Cell Microbiol*.
- Neurath, M. F. 2014. 'Cytokines in inflammatory bowel disease', *Nat Rev Immunol*, 14: 329-42.

- Ng, Siew C., Hai Yun Shi, Nima Hamidi, Fox E. Underwood, Whitney Tang, Eric I. Benchimol, . . . Gilaad G. Kaplan. 2017. 'Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies', *The Lancet*, 390: 2769-78.
- Ng, Wai-Leung, and Bonnie L. Bassler. 2009. 'Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures', *Annual Review of Genetics*, 43: 197-222.
- Ng, Wai-Leung, Lark J. Perez, Yunzhou Wei, Christina Kraml, Martin F. Semmelhack, and Bonnie L. Bassler. 2011. 'Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems', *Molecular Microbiology*, 79: 1407-17.
- Nguyen, L. P., and C. A. Bradfield. 2008. 'The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor', *Chem Res Toxicol*, 21: 102-16.
- Nikolaus, Susanna, Natalie Al-Massad, Johannes Bethge, Georg H. Waetzig, Philip C. Rosenstiel, Ralf Junker, . . . Stefan Schreiber. 2014. 'Su1079 Tryptophan Deficiency in Crohn Disease', *Gastroenterology*, 146: S-366-S-67.
- Nishida, A., R. Inoue, O. Inatomi, S. Bamba, Y. Naito, and A. Andoh. 2018. 'Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease', *Clin J Gastroenterol*, 11: 1-10.
- Norman, J. M., S. A. Handley, M. T. Baldrige, L. Droit, C. Y. Liu, B. C. Keller, . . . H. W. Virgin. 2015. 'Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease', *Cell*, 160: 447-60.
- Novick, R. P., S. J. Projan, J. Kornblum, H. F. Ross, G. Ji, B. Kreiswirth, . . . R. P. Novick. 1995. 'Theagr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*', *Molecular and General Genetics MGG*, 248: 446-58.
- Nusrat, A., C. von Eichel-Streiber, J. R. Turner, P. Verkade, J. L. Madara, and C. A. Parkos. 2001. 'Clostridium difficile Toxins Disrupt Epithelial Barrier Function by Altering Membrane Microdomain Localization of Tight Junction Proteins', *Infection and Immunity*, 69: 1329-36.
- Nystrom, E. E. L., G. M. H. Birchenough, S. van der Post, L. Arike, A. D. Gruber, G. C. Hansson, and M. E. V. Johansson. 2018. 'Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1 (CLCA1) Controls Mucus Expansion in Colon by Proteolytic Activity', *EBioMedicine*, 33: 134-43.
- Odenwald, M. A., and J. R. Turner. 2013. 'Intestinal permeability defects: is it time to treat?', *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11: 1075-83.
- Odenwald, M. A., and J. R. Turner. 2016. 'The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target?', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
- Ogasawara, N., T. Kojima, M. Go, T. Ohkuni, J. Koizumi, R. Kamekura, . . . N. Sawada. 2010. 'PPARgamma agonists upregulate the barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells', *Pharmacol Res*, 61: 489-98.
- Oh, S., G. W. Go, E. Mylonakis, and Y. Kim. 2012. 'The bacterial signalling molecule indole attenuates the virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*', *J Appl Microbiol*, 113: 622-8.
- Ohland, C. L., and C. Jobin. 2015. 'Microbial activities and intestinal homeostasis: A delicate balance between health and disease', *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1: 28-40.
- Ohtani, Kaori, Yonghui Yuan, Sufi Hassan, Ruoyu Wang, Yun Wang, and Tohru Shimizu. 2009. 'Virulence Gene Regulation by the agr System in *Clostridium perfringens*', *Journal of bacteriology*, 191: 3919-27.
- Okayasu, Isao, Shigeru Hatakeyama, Masahiro Yamada, Toshifumi Ohkusa, Yoshio Inagaki, and Rintaro Nakaya. 1990. 'A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice', *Gastroenterology*, 98: 694-702.
- Ordás, Ingrid, Lars Eckmann, Mark Talamini, Daniel C. Baumgart, and William J. Sandborn. 2012. 'Ulcerative colitis', *The Lancet*, 380: 1606-19.
- Orholm, M., P. Munkholm, E. Langholz, O. H. Nielsen, T. I. Sorensen, and V. Binder. 1991. 'Familial occurrence of inflammatory bowel disease', *N Engl J Med*, 324: 84-8.
- Ouellette, A. J., R. M. Greco, M. James, D. Frederick, J. Naftilan, and J. T. Fallon. 1989. 'Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium', *J Cell Biol*, 108: 1687-95.
- Pacheco, A. R., and V. Sperandio. 2009. 'Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host', *Curr Op Microbiol*.
- Padder, Sajad Ahmad, Rajendra Prasad, and Abdul Haseeb Shah. 2018. 'Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi', *Microbiological Research*, 210: 51-58.

- Park, S. W., G. Zhen, C. Verhaeghe, Y. Nakagami, L. T. Nguyenvu, A. J. Barczak, . . . D. J. Erle. 2009. 'The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 6950-5.
- Parsek, Matthew R., and E. P. Greenberg. 2005. 'Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms', *Trends in Microbiology*, 13: 27-33.
- Patrick, D. M., A. K. Leone, J. J. Shellenberger, K. A. Dudowicz, and J. M. King. 2006. 'Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate epithelial barrier function in Madin-Darby canine kidney cells through mitogen activated protein kinase signaling', *BMC Physiol*, 6: 2.
- Pearce, Sarah C., Arwa Al-Jawadi, Kunihiro Kishida, Shiyan Yu, Madeleine Hu, Luke F. Fritzky, . . . Ronaldo P. Ferraris. 2018a. 'Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types', *BMC Biology*, 16: 19.
- Pearce, Sarah C., Heidi G. Coia, J. P. Karl, Ida G. Pantoja-Feliciano, Nicholas C. Zachos, and Kenneth Racicot. 2018b. 'Intestinal in vitro and ex vivo Models to Study Host-Microbiome Interactions and Acute Stressors', *Frontiers in Physiology*, 9.
- Pearce, Sarah C., Gregory J. Weber, Dana M. van Sambeek, Jason W. Soares, Kenneth Racicot, and David T. Breault. 2020. 'Intestinal enteroids recapitulate the effects of short-chain fatty acids on the intestinal epithelium', *PloS one*, 15: e0230231.
- Pearson, A. D., E. J. Eastham, M. F. Laker, A. W. Craft, and R. Nelson. 1982. 'Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease', *Br Med J (Clin Res Ed)*, 285: 20-1.
- Peeters, M., B. Geypens, D. Claus, H. Nevens, Y. Ghoo, G. Verbeke, . . . P. Rutgeerts. 1997. 'Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease', *Gastroenterology*, 113: 802-07.
- Peng, L., Z. He, W. Chen, I. R. Holzman, and J. Lin. 2007. 'Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier', *Pediatr Res*, 61: 37-41.
- Peng, L., Z. R. Li, R. S. Green, I. R. Holzman, and J. Lin. 2009. 'Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers', *J Nutr*, 139: 1619-25.
- Pereira, C. S., J. A. Thompson, and K. B. Xavier. 2013. 'AI-2-mediated signalling in bacteria', *FEMS Microbiol Rev*, 37: 156-81.
- Pesci, Everett C, Jared BJ Milbank, James P Pearson, Susan McKnight, Andrew S Kende, E Peter Greenberg, and Barbara H Iglewski. 1999. 'Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 11229-34.
- Petersson, J., O. Schreiber, G. C. Hansson, S. J. Gendler, A. Velcich, J. O. Lundberg, . . . M. Phillipson. 2011. 'Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300: G327-33.
- Petit, C. S., F. Barreau, L. Besnier, P. Gandille, B. Riveau, D. Chateau, . . . S. Thenet. 2012. 'Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease', *Gastroenterology*, 143: 122-32 e15.
- Peyrottes, A. 2019. 'Modulation of Inflammation in Intestinal Epithelial and Immune Cells by N-Acyl Homoserine Lactones and their Synthetic Analogues', Sorbonne Université.
- Piovani, D., S. Danese, L. Peyrin-Biroulet, G. K. Nikolopoulos, T. Lytras, and S. Bonovas. 2019. 'Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses', *Gastroenterology*, 157: 647-59 e4.
- Piper, Robert C, Ivan Dikic, and Gergely L Lukacs. 2014. 'Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6: a016808.
- Ploss, A., M. J. Evans, V. A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y. P. de Jong, and C. M. Rice. 2009. 'Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells', *Nature*, 457: 882-6.
- Png, Chin Wen, Sara K Lindén, Kristen S Gilshenan, Erwin G Zoetendal, Chris S McSweeney, Lindsay I Sly, . . . Timothy H J Florin. 2010. 'Mucolytic Bacteria With Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment In Vitro Utilization of Mucin by Other Bacteria', *American Journal of Gastroenterology*, 105: 2420-28.

- Panferrada, A., J. R. Caso, L. Alou, A. Colon, D. Sevillano, M. A. Moro, . . . L. Menchen. 2007. 'The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction', *Gastroenterology*, 132: 1791-803.
- Postal, Barbara G., Sara Ghezal, Doriane Aguanno, Sébastien André, Kevin Garbin, Laurent Genser, . . . Véronique Carrière. 2020. 'AhR activation defends gut barrier integrity against damage occurring in obesity', *Molecular Metabolism*: 101007.
- Prasad, S., R. Mingrino, K. Kaukinen, K. L. Hayes, R. M. Powell, T. T. MacDonald, and J. E. Collins. 2005. 'Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells', *Lab Invest*, 85: 1139-62.
- Prescott, R. D., and A. W. Decho. 2020. 'Flexibility and Adaptability of Quorum Sensing in Nature', *Trends Microbiol.*
- Propheter, D. C., A. L. Chara, T. A. Harris, K. A. Ruhn, and L. V. Hooper. 2017. 'Resistin-like molecule beta is a bactericidal protein that promotes spatial segregation of the microbiota and the colonic epithelium', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 11027-33.
- Pullan, R D, G A Thomas, M Rhodes, R G Newcombe, G T Williams, A Allen, and J Rhodes. 1994. 'Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis', *Gut*, 35: 353-59.
- Putsep, K., L. G. Axelsson, A. Boman, T. Midtvedt, S. Normark, H. G. Boman, and M. Andersson. 2000. 'Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins', *J Biol Chem*, 275: 40478-82.
- Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, . . . J. Wang. 2010. 'A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing', *Nature*, 464: 59-65.
- Quevrain, E., M. A. Maubert, C. Michon, F. Chain, R. Marquant, J. Tailhades, . . . P. Seksik. 2016a. 'Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease', *Gut*.
- Quevrain, E., M. A. Maubert, H. Sokol, B. Devreese, and P. Seksik. 2016b. 'The presence of the anti-inflammatory protein MAM, from *Faecalibacterium prausnitzii*, in the intestinal ecosystem', *Gut*.
- Radtke, Freddy, and Hans Clevers. 2005. 'Self-Renewal and Cancer of the Gut: Two Sides of a Coin', *Science*, 307: 1904-09.
- Raikwar, N. S., A. Vandewalle, and C. P. Thomas. 2010. 'Nedd4-2 interacts with occludin to inhibit tight junction formation and enhance paracellular conductance in collecting duct epithelia', *Am J Physiol Renal Physiol*, 299: F436-44.
- Raimondi, F., P. Santoro, M. V. Barone, S. Pappacoda, M. L. Barretta, M. Nanayakkara, . . . R. Paludetto. 2008. 'Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294: G906-13.
- Rajilic-Stojanovic, M., and W. M. de Vos. 2014. 'The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota', *FEMS Microbiol Rev*, 38: 996-1047.
- Raleigh, D. R., Yong Marchiando Am Fau - Zhang, Le Zhang Y Fau - Shen, Hiroyuki Shen L Fau - Sasaki, Yingmin Sasaki H Fau - Wang, Manyuan Wang Y Fau - Long, . . . J. R. Turner. 2010. 'Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions', *Mol Biol Cell*.
- Ramakers, J. D., M. I. Verstege, G. Thuijls, A. A. Te Velde, R. P. Mensink, and J. Plat. 2007. 'The PPARgamma agonist rosiglitazone impairs colonic inflammation in mice with experimental colitis', *J Clin Immunol*, 27: 275-83.
- Rebuffat, S. 2012. 'Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria', *Biochem Soc Trans*, 40: 1456-62.
- Reinehr, T., and C. L. Roth. 2015. 'The gut sensor as regulator of body weight', *Endocrine*, 49: 35-50.
- Resta-Lenert, Silvia, and Kim E. Barrett. 2006. 'Probiotics and Commensals Reverse TNF- α - and IFN- γ -Induced Dysfunction in Human Intestinal Epithelial Cells', *Gastroenterology*, 130: 731-46.
- Riazuddin, S., Z. M. Ahmed, A. S. Fanning, A. Lagziel, S. Kitajiri, K. Ramzan, . . . T. B. Friedman. 2006. 'Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing', *Am J Hum Genet*, 79: 1040-51.
- Ritchie, A. J., C. Whittall, J. J. Lazenby, S. R. Chhabra, D. I. Pritchard, and M. A. Cooley. 2007. 'The immunomodulatory *Pseudomonas aeruginosa* signalling molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone enters mammalian cells in an unregulated fashion', *Immunol Cell Biol*, 85: 596-602.

- Ritchie, AJ, Andreas Jansson, J Stallberg, Patric Nilsson, P Lysaght, and MA Cooley. 2005. 'The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation', *Infection and Immunity*, 73: 1648-55.
- Roxas, J. L., A. Koutsouris, A. Bellmeyer, S. Tesfay, S. Royan, K. Falzari, . . . G. Hecht. 2010. 'Enterohemorrhagic *E. coli* alters murine intestinal epithelial tight junction protein expression and barrier function in a Shiga toxin independent manner', *Lab Invest*, 90: 1152-68.
- Roxas, J. L., R. C. Monasky, B. A. P. Roxas, A. B. Agellon, A. Mansoor, J. B. Kaper, . . . V. K. Viswanathan. 2018a. 'Enteropathogenic *Escherichia coli* EspH-Mediated Rho GTPase Inhibition Results in Desmosomal Perturbations', *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 6: 163-80.
- Roxas, J. L., and V. K. Viswanathan. 2018b. 'Modulation of Intestinal Paracellular Transport by Bacterial Pathogens', *Compr Physiol*, 8: 823-42.
- Rudner, D. Z., J. R. LeDeaux, K. Ireton, and A. D. Grossman. 1991. 'The *spo0K* locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence', *Journal of bacteriology*, 173: 1388.
- Ruiz-Roldan, L., A. Belles, J. Bueno, J. M. Azcona-Gutierrez, B. Rojo-Bezares, C. Torres, . . . C. Seral. 2018. '*Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Children: Occurrence in Faecal Samples, Antimicrobial Resistance, Virulence, and Molecular Typing', *Biomed Res Int*, 2018: 8060178.
- Rumbaugh, Kendra P., and Gunnar F. Kaufmann. 2012. 'Exploitation of host signaling pathways by microbial quorum sensing signals', *Current Opinion in Microbiology*, 15: 162-68.
- Rutherford, Steven T, and Bonnie L Bassler. 2012. 'Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2: a012427.
- Saitou, M., K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, . . . S. Tsukita. 1998. 'Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions', *J Cell Biol*, 141: 397-408.
- Saitou, Mitinori, Mikio Furuse, Hiroyuki Sasaki, Jörg-Dieter Schulzke, Michael Fromm, Hiroshi Takano, . . . Shoichiro Tsukita. 2000. 'Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands', *Molecular biology of the cell*, 11: 4131-42.
- Samarin, Stanislav N., Andrei I. Ivanov, Gilles Flatau, Charles A. Parkos, and Asma Nusrat. 2007. 'Rho/Rho-associated Kinase-II Signaling Mediates Disassembly of Epithelial Apical Junctions', *Molecular biology of the cell*, 18: 3429-39.
- Sarathy, J., S. J. Detloff, M. Ao, N. Khan, S. French, H. Sirajuddin, . . . M. C. Rao. 2017. 'The Yin and Yang of bile acid action on tight junctions in a model colonic epithelium', *Physiol Rep*, 5: e13294.
- Sartor, R. Balfour. 2008. 'Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases', *Gastroenterology*, 134: 577-94.
- Sasaki, Maiko, Shanti V. Sitaraman, Brian A. Babbitt, Peter Gerner-Smidt, Efrain M. Ribot, Nancy Garrett, . . . Jan-Michael A. Klapproth. 2007. 'Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease', *Laboratory Investigation*, 87: 1042-54.
- Sato, Toshiro, Robert G. Vries, Hugo J. Snippert, Marc van de Wetering, Nick Barker, Daniel E. Stange, . . . Hans Clevers. 2009. 'Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche', *Nature*, 459: 262.
- Sausset, R., M. A. Petit, V. Gaboriau-Routhiau, and M. De Paepe. 2020. 'New insights into intestinal phages', *Mucosal Immunol*.
- Schaefer, Amy L., E. P. Greenberg, Colin M. Oliver, Yasuhiro Oda, Jean J. Huang, Gili Bittan-Banin, . . . Caroline S. Harwood. 2008. 'A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals', *Nature*, 454: 595-99.
- Schauder, Stephan, and Bonnie L Bassler. 2001a. 'The languages of bacteria', *Genes & Development*, 15: 1468-80.
- Schauder, Stephan, Kevan Shokat, Michael G. Surette, and Bonnie L. Bassler. 2001b. 'The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule', *Molecular Microbiology*, 41: 463-76.
- Schmitz, H., C. Barmeyer, M. Fromm, N. Runkel, H. D. Foss, C. J. Bentzel, . . . J. D. Schulzke. 1999. 'Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis', *Gastroenterology*, 116: 301-9.

- Schroeder, B. O., G. M. H. Birchenough, M. Stahlman, L. Arike, M. E. V. Johansson, G. C. Hansson, and F. Backhed. 2018. 'Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration', *Cell Host Microbe*, 23: 27-40 e7.
- Schuster, Martin, C Phoebe Lostroh, Tomoo Ogi, and E Peter Greenberg. 2003. 'Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis', *Journal of bacteriology*, 185: 2066-79.
- Schwarz, B. T., F. Wang, L. Shen, D. R. Clayburgh, L. Su, Y. Wang, . . . J. R. Turner. 2007. 'LIGHT signals directly to intestinal epithelia to cause barrier dysfunction via cytoskeletal and endocytic mechanisms', *Gastroenterology*, 132: 2383-94.
- Schwarzer, C., Z. Fu, M. Patanwala, L. Hum, M. Lopez-Guzman, B. Illek, . . . T. E. Machen. 2012. 'Pseudomonas aeruginosa biofilm-associated homoserine lactone C12 rapidly activates apoptosis in airway epithelia', *Cell Microbiol*, 14: 698-709.
- Schwarzer, Christian, Bharat Ravishankar, Maria Patanwala, Stacey Shuai, Zhu Fu, Beate Illek, . . . Terry E Machen. 2014. 'Thapsigargin blocks *Pseudomonas aeruginosa* homoserine lactone-induced apoptosis in airway epithelia', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 306: C844-C55.
- Segain, Jean-Pierre, Diane Raingeard de la Blétière, Vincent Sauzeau, Arnaud Bourreille, Gréory Hilarret, Chrystelle Cario-Toumaniantz, . . . Gervaise Loirand. 2003. 'Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor κ B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis', *Gastroenterology*, 124: 1180-87.
- Sellon, Rance K., Susan Tonkonogy, Michael Schultz, Levinus A. Dieleman, Wetonia Grenther, Ed Balish, . . . R. Balfour Sartor. 1998. 'Resident Enteric Bacteria Are Necessary for Development of Spontaneous Colitis and Immune System Activation in Interleukin-10-Deficient Mice', *Infection and Immunity*, 66: 5224-31.
- Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo. 2016. 'Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body', *PLoS Biol*, 14: e1002533.
- Seth, A., Fang Yan, D. Brent Polk, and R. K. Rao. 2008. 'Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294: G1060-G69.
- Shamir, Raanan, Corina Hartman, Rachel Karry, Elsa Pavlotzky, Rami Eliakim, Jesse Lachter, . . . Michael Aviram. 2005. 'Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: Selective secretion of PON1 and PON2', *Free Radical Biology and Medicine*, 39: 336-44.
- Shapiro, H., C. A. Thaiss, M. Levy, and E. Elinav. 2014. 'The cross talk between microbiota and the immune system: metabolites take center stage', *Curr Opin Immunol*, 30: 54-62.
- Sharpstone, D, P Neild, R Crane, C Taylor, C Hodgson, R Sherwood, . . . I Bjarnason. 1999. 'Small intestinal transit, absorption, and permeability in patients with AIDS with and without diarrhoea', *Gut*, 45: 70-76.
- Shaw, M. H., N. Kamada, N. Warner, Y. G. Kim, and G. Nunez. 2011. 'The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation', *Trends Immunol*, 32: 73-9.
- Shen, L., C. R. Weber, D. R. Raleigh, D. Yu, and J. R. Turner. 2011. 'Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo', *Annu Rev Physiol*, 73: 283-309.
- Shen, Le, Eric D Black, Edwina D Witkowski, Wayne I Lencer, Vince Guerriero, Eveline E Schneeberger, and Jerrold R Turner. 2006. 'Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure', *Journal of cell science*, 119: 2095-106.
- Shen, Le, and Jerrold R. Turner. 2005. 'Actin Depolymerization Disrupts Tight Junctions via Caveolae-mediated Endocytosis', *Molecular biology of the cell*, 16: 3919-36.
- Shifflett, D. E., D. R. Clayburgh, A. Koutsouris, J. R. Turner, and G. A. Hecht. 2005. 'Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure in vivo', *Lab Invest*, 85: 1308-24.
- Shin, Ji-Hee, Young-Kwan Lee, Woo-Jeong Shon, Bora Kim, Che Ok Jeon, Joo-Youn Cho, . . . Dong-Mi Shin. 2020. 'Gut microorganisms and their metabolites modulate the severity of acute colitis in a tryptophan metabolism-dependent manner', *European Journal of Nutrition*.

- Shiner, E. K., D. Terentyev, A. Bryan, S. Sennoune, R. Martinez-Zaguilan, G. Li, . . . K. P. Rumbaugh. 2006. 'Pseudomonas aeruginosa autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling', *Cell Microbiol*, 8: 1601-10.
- Shiomi, R., K. Shigetomi, T. Inai, M. Sakai, and J. Ikenouchi. 2015. 'CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier', *Sci Rep*, 5: 13262.
- Shkoporov, Andrey N., and Colin Hill. 2019. 'Bacteriophages of the Human Gut: The "Known Unknown" of the Microbiome', *Cell Host & Microbe*, 25: 195-209.
- Sifri, Costi D., Eleftherios Mylonakis, Kavindra V. Singh, Xiang Qin, Danielle A. Garsin, Barbara E. Murray, . . . Stephen B. Calderwood. 2002. 'Virulence Effect of Enterococcus faecalis Protease Genes and the Quorum-Sensing Locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and Mice', *Infection and Immunity*, 70: 5647-50.
- Silpe, Justin E., and Bonnie L. Bassler. 2019. 'A Host-Produced Quorum-Sensing Autoinducer Controls a Phage Lysis-Lysogeny Decision', *Cell*, 176: 268-80.e13.
- Simonovic, Ivana, Jonathan Rosenberg, Athanasia Koutsouris, and Gail Hecht. 2000. 'Enteropathogenic Escherichia coli dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions', *Cellular Microbiology*, 2: 305-15.
- Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg. 2000. 'Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms', *Nature*, 407: 762-4.
- Smecuol, E., J. C. Bai, H. Vazquez, Z. Kogan, A. Cabanne, S. Niveloni, . . . J. B. Meddings. 1997. 'Gastrointestinal permeability in celiac disease', *Gastroenterology*, 112: 1129-36.
- Smith, Jenée N., and Brian M. M. Ahmer. 2003. 'Detection of Other Microbial Species by Salmonella: Expression of the SdiA Regulon', *Journal of bacteriology*, 185: 1357-66.
- Smith, K., K. D. McCoy, and A. J. Macpherson. 2007. 'Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota', *Semin Immunol*, 19: 59-69.
- Smith, R. S., E. R. Fedyk, T. A. Springer, N. Mukaida, B. H. Iglewski, and R. P. Phipps. 2001. 'IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the Pseudomonas autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2', *J Immunol*, 167: 366-74.
- Smith, R. S., S. G. Harris, R. Phipps, and B. Iglewski. 2002. 'The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo', *J Bacteriol*, 184: 1132-9.
- Sokol, H., V. Leducq, H. Aschard, H. P. Pham, S. Jegou, C. Landman, . . . L. Beaugerie. 2016. 'Fungal microbiota dysbiosis in IBD', *Gut*.
- Sokol, H., P. Lepage, P. Seksik, J. Doré, and P. Marteau. 2006. 'Temperature Gradient Gel Electrophoresis of Fecal 16S rRNA Reveals Active Escherichia coli in the Microbiota of Patients with Ulcerative Colitis', *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3172-77.
- Sokol, H., B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L. G. Bermudez-Humaran, J. J. Gratadoux, . . . P. Langella. 2008. 'Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 16731-6.
- Sokol, H., P. Seksik, J. P. Furet, O. Firmesse, I. Nion-Larmurier, L. Beaugerie, . . . J. Doré. 2009. 'Low Counts of Faecalibacterium prausnitzii in Colitis Microbiota', *Inflammatory bowel diseases*, 15: 1183-89.
- Sonnenburg, J. L., and E. D. Sonnenburg. 2019. 'Vulnerability of the industrialized microbiota', *Science*, 366.
- Spehlmann, M. E., A. Z. Begun, J. Burghardt, P. Lepage, A. Raedler, and S. Schreiber. 2008. 'Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study', *Inflamm Bowel Dis*, 14: 968-76.
- Sperandio, V., A. G. Torres, B. Jarvis, J. P. Nataro, and J. B. Kaper. 2003. 'Bacteria-host communication: the language of hormones', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8951-6.
- Spindler, V., M. Meir, B. Vigh, S. Flemming, K. Hutz, C. T. Germer, . . . N. Schlegel. 2015. 'Loss of Desmoglein 2 Contributes to the Pathogenesis of Crohn's Disease', *Inflamm Bowel Dis*, 21: 2349-59.

- Stamatovic, S. M., A. M. Johnson, N. Sladojevic, R. F. Keep, and A. V. Andjelkovic. 2017. 'Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling', *Ann N Y Acad Sci*, 1397: 54-65.
- Stevens, Ann M, Katherine M Dolan, and E Peter Greenberg. 1994. 'Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 12619-23.
- Stevenson, Bruce R, Janet D Siliciano, Mark S Mooseker, and Daniel A Goodenough. 1986. 'Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia', *J Cell Biol*, 103: 755-66.
- Stoltz, David A, Egon A Ozer, Carey J Ng, Janet M Yu, Srinivasa T Reddy, Aldons J Lusis, . . . Diana M Shih. 2007. 'Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia', *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292: L852-L60.
- Stoodle, B. J., and B. T. Thom. 1970. 'Observations On The Intestinal Carriage Of *Pseudomonas Aeruginosa*', *Journal of Medical Microbiology*, 3: 367-75.
- Storr, M., H. J. Vogel, and R. Schicho. 2013. 'Metabolomics: is it useful for inflammatory bowel diseases?', *Curr Opin Gastroenterol*, 29: 378-83.
- Strauman, M. C., J. M. Harper, S. M. Harrington, E. J. Boll, and J. P. Nataro. 2010. 'Enteroggregative *Escherichia coli* disrupts epithelial cell tight junctions', *Infect Immun*, 78: 4958-64.
- Su, L., S. C. Nalle, L. Shen, E. S. Turner, G. Singh, L. A. Breskin, . . . J. R. Turner. 2013. 'TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis', *Gastroenterology*, 145: 407-15.
- Su, L., L. Shen, D. R. Clayburgh, S. C. Nalle, E. A. Sullivan, J. B. Meddings, . . . J. R. Turner. 2009. 'Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis', *Gastroenterology*, 136: 551-63.
- Surette, Michael G., Melissa B. Miller, and Bonnie L. Bassler. 1999. 'Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 1639-44.
- Suzuki, K., Y. Kokai, N. Sawada, R. Takakuwa, K. Kuwahara, E. Isogai, . . . M. Mori. 2002. 'SS1 *Helicobacter pylori* disrupts the paracellular barrier of the gastric mucosa and leads to neutrophilic gastritis in mice', *Virchows Arch*, 440: 318-24.
- Suzuki, T. 2013. 'Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions', *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Suzuki, T. 2020. 'Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions', *Anim Sci J*, 91: e13357.
- Suzuki, T., N. Yoshinaga, and S. Tanabe. 2011. 'Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium', *J Biol Chem*, 286: 31263-71.
- Swatek, K. N., and D. Komander. 2016. 'Ubiquitin modifications', *Cell Res*, 26: 399-422.
- Swearingen, Matthew C., Anice Sabag-Daigle, and Brian M. M. Ahmer. 2013. 'Are There Acyl-Homoserine Lactones within Mammalian Intestines?', *Journal of bacteriology*, 195: 173-79.
- Swidsinski, Alexander, Vera Loening-Baucke, Franz Theissig, Holger Engelhardt, Stig Bengmark, Stefan Koch, . . . Yvonne Dörffel. 2007. 'Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon', *Gut*, 56: 343-50.
- Szentkuti, L., H. Riedesel, M. L. Enss, K. Gaertner, and W. Von Engelhardt. 1990. 'Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats', *Histochem J*, 22: 491-7.
- Taguchi, Ryoko, Shinya Tanaka, Ga-Hyun Joe, Hideaki Maseda, Nobuhiko Nomura, Junji Ohnishi, . . . Hitoshi Miyazaki. 2014. 'Mucin 3 is involved in intestinal epithelial cell apoptosis via N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone-induced suppression of Akt phosphorylation', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 307: C162-C68.
- Takano, Eriko, Rekha Chakraborty, Takuya Nihira, Yashuhiro Yamada, and Mervyn J. Bibb. 2001. 'A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Molecular Microbiology*, 41: 1015-28.
- Takeichi, M. 2014. 'Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 397-410.

- Taleb, S. 2019. 'Tryptophan Dietary Impacts Gut Barrier and Metabolic Diseases', *Front Immunol*, 10: 2113.
- Tanno, H., and M. Komada. 2013. 'The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway', *J Biochem*, 153: 497-504.
- Tao, S., Y. Luo, He Bin, J. Liu, X. Qian, Y. Ni, and R. Zhao. 2016. 'Paraoxonase 2 modulates a proapoptotic function in LS174T cells in response to quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone', *Sci Rep*.
- Tao, Shiyu, Liqiong Niu, Liuping Cai, Yali Geng, Canfeng Hua, Yingdong Ni, and Ruqian Zhao. 2018. 'N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone modulates mitochondrial function and suppresses proliferation in intestinal goblet cells', *Life Sciences*, 201: 81-88.
- Tao, Shiyu, Qinwei Sun, Liuping Cai, Yali Geng, Canfeng Hua, Yingdong Ni, and Ruqian Zhao. 2019. 'Caspase-1-dependent mechanism mediating the harmful impacts of the quorum-sensing molecule N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone on the intestinal cells', *Journal of Cellular Physiology*, 234: 3621-33.
- Tap, J., S. Mondot, F. Levenez, E. Pelletier, C. Caron, J. P. Furet, . . . M. Leclerc. 2009. 'Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core', *Environ Microbiol*, 11: 2574-84.
- Tateda, K., Y. Ishii, M. Horikawa, T. Matsumoto, S. Miyairi, J. C. Pechere, . . . K. Yamaguchi. 2003. 'The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils', *Infect Immun*, 71: 5785-93.
- Teiber, J. F., S. Horke, D. C. Haines, P. K. Chowdhary, J. Xiao, G. L. Kramer, . . . D. I. Draganov. 2008. 'Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone', *Infect Immun*, 76: 2512-9.
- Teixeira, T. F., N. C. Souza, P. G. Chiarello, S. C. Franceschini, J. Bressan, C. L. Ferreira, and C. Peluzio Mdo. 2012. 'Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors', *Clin Nutr*, 31: 735-40.
- Telford, Gary, D Wheeler, Paul Williams, PT Tomkins, P Appleby, Herbert Sewell, . . . David I Pritchard. 1998. 'The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity', *Infection and Immunity*, 66: 36-42.
- Thompson, Jessica Ann, Rita Almeida Oliveira, Ana Djukovic, Carles Ubeda, and Karina Bivar Xavier. 2015. 'Manipulation of the Quorum Sensing Signal AI-2 Affects the Antibiotic-Treated Gut Microbiota', *Cell Reports*, 10: 1861-71.
- Thomson, A., K. Smart, M. S. Somerville, S. N. Lauder, G. Appanna, J. Horwood, . . . A. Godkin. 2019. 'The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease', *BMC Gastroenterol*, 19: 98.
- Throup, John P, Miguel Camara, Geoffrey S Briggs, Michael K Winson, Siri Ram Chhabra, Barrie W Bycroft, . . . Gordon SAB Stewart. 1995. 'Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules', *Molecular Microbiology*, 17: 345-56.
- Thuong, M., K. Arvaniti, R. Ruimy, P. de la Salmonière, A. Scanvic-Hameg, J. C. Lucet, and B. Régnier. 2003. 'Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit', *Journal of Hospital Infection*, 53: 274-82.
- Tokuda, Shinsaku, Tomohito Higashi, and Mikio Furuse. 2014. 'ZO-1 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: involvement of ZO-1 in the regulation of cytoskeleton and cell shape', *PloS one*, 9: e104994.
- Traweger, A., D. Fang, Y. C. Liu, W. Stelzhammer, I. A. Krizbai, F. Fresser, . . . H. Bauer. 2002. 'The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch', *J Biol Chem*, 277: 10201-8.
- Tsukamoto, Tatsuo, and Sanjay K. Nigam. 1999. 'Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 276: F737-F50.
- Turner, J. R. 2000. 'Show me the pathway! Regulation of paracellular permeability by Na(+)-glucose cotransport', *Adv Drug Deliv Rev*, 41: 265-81.
- Turner, J. R. 2009. 'Intestinal mucosal barrier function in health and disease', *Nat Rev Immunol*, 9: 799-809.

- Tysk, C, E Lindberg, G Järnerot, and B Floderus-Myrhed. 1988. 'Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking', *Gut*, 29: 990.
- Ukabam, S. O., J. R. Clamp, and B. T. Cooper. 1983. 'Abnormal small intestinal permeability to sugars in patients with Crohn's disease of the terminal ileum and colon', *Digestion*, 27: 70-4.
- Umeda, Kazuaki, Takeshi Matsui, Mayumi Nakayama, Kyoko Furuse, Hiroyuki Sasaki, Mikio Furuse, and Shoichiro Tsukita. 2004. 'Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 44785-94.
- Underhill, David M., and Iliyan D. Iliev. 2014. 'The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system', *Nature Reviews Immunology*, 14: 405-16.
- Ungaro, F., L. Massimino, S. D'Alessio, and S. Danese. 2019. 'The gut virome in inflammatory bowel disease pathogenesis: From metagenomics to novel therapeutic approaches', *United European Gastroenterol J*, 7: 999-1007.
- Utech, M., R. Mennigen, and M. Bruewer. 2010. 'Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation', *J Biomed Biotechnol*, 2010: 484987.
- Utech, Markus, Andrei I. Ivanov, Stanislav N. Samarin, Matthias Bruewer, Jerrold R. Turner, Randall J. Mrsny, . . . Asma Nusrat. 2005. 'Mechanism of IFN-gamma-induced Endocytosis of Tight Junction Proteins: Myosin II-dependent Vacuolarization of the Apical Plasma Membrane', *Molecular biology of the cell*, 16: 5040-52.
- Van der Sluis, M., B. A. De Koning, A. C. De Bruijn, A. Velcich, J. P. Meijerink, J. B. Van Goudoever, . . . A. W. Einerhand. 2006. 'Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection', *Gastroenterology*, 131: 117-29.
- Van Itallie, C. M., and J. M. Anderson. 2018. 'Phosphorylation of tight junction transmembrane proteins: Many sites, much to do', *Tissue Barriers*, 6: e1382671.
- Van Itallie, C. M., Jennifer Fanning As Fau - Holmes, James M. Holmes J Fau - Anderson, and J. M. Anderson. 2010. 'Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers', *J Cell Sci*.
- Van Itallie, Christina M, Alan S Fanning, Arlene Bridges, and James M Anderson. 2009. 'ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton', *Molecular biology of the cell*, 20: 3930-40.
- Venkatesh, M., S. Mukherjee, H. Wang, H. Li, K. Sun, A. P. Benechet, . . . S. Mani. 2014. 'Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4', *Immunity*, 41: 296-310.
- Verbeurgt, Christophe, Alex Veithen, Sbastien Carlot, Maxime Tarabichi, Jacques E. Dumont, Sergio Hassid, and Pierre Chatelain. 2017. 'The human bitter taste receptor T2R38 is broadly tuned for bacterial compounds', *PloS one*, 12: e0181302.
- Vernia, P., A. Gnaedinger, W. Hauck, and R. I. Breuer. 1988. 'Organic anions and the diarrhea of inflammatory bowel disease', *Digestive Diseases and Sciences*, 33: 1353-58.
- Vetrano, S., M. Rescigno, M. R. Cera, C. Correale, C. Rumio, A. Doni, . . . S. Danese. 2008. 'Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease', *Gastroenterology*, 135: 173-84.
- Vikstrom, E., L. Bui, P. Konradsson, and K. E. Magnusson. 2009. 'The junctional integrity of epithelial cells is modulated by Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms', *Exp Cell Res*, 315: 313-26.
- Vikstrom, E., F. Tafazoli, and K. E. Magnusson. 2006. 'Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells', *FEBS Lett*, 580: 6921-8.
- Vikstrom, Elena, Lan Bui, Peter Konradsson, and Karl-Eric Magnusson. 2010. 'Role of calcium signalling and phosphorylations in disruption of the epithelial junctions by Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecule', *European Journal of Cell Biology*, 89: 584-97.
- Vikström, Elena, Karl-Eric Magnusson, and Augustas Pivoriūnas. 2005. 'The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone stimulates phagocytic activity in human macrophages through the p38 MAPK pathway', *Microbes and infection*, 7: 1512-18.

- Vinolo, M. A., H. G. Rodrigues, E. Hatanaka, F. T. Sato, S. C. Sampaio, and R. Curi. 2011. 'Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils', *J Nutr Biochem*, 22: 849-55.
- Vivinus-Nébot, M, G Frin-Mathy, H Bziouche, R Dainese, G Bernard, R Anty, . . . T Piche. 2014. 'Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation', *Gut*, 63: 744-52.
- Vu, John, and John Carvalho. 2011. 'Enterococcus: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology', *Frontiers in Biology*, 6: 357-66.
- Vuotto, Fanny, Céline Berthon, Nadine Lemaitre, Alain Duhamel, Sandy Balkaran, Emmanuelle Le Ray, . . . Serge Alfandari. 2013. 'Risk factors, clinical features, and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with hematologic malignancies: A case-control study', *American Journal of Infection Control*, 41: 527-30.
- Wagner, Christof, Sabine Zimmermann, Gerald Brenner-Weiss, Friederike Hug, Birgit Prior, Ursula Obst, and Gertrud Maria Hänsch. 2007. 'The quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN)', *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387: 481.
- Walmsley, RS, A Anthony, R Sim, RE Pounder, and AJ Wakefield. 1998. 'Absence of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Klebsiella pneumoniae* antigens within inflammatory bowel disease tissues', *Journal of clinical pathology*, 51: 657-61.
- Walters, Matthew, Marcelo P Sircili, and Vanessa Sperandio. 2006a. 'AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli*', *Journal of bacteriology*, 188: 5668-81.
- Walters, Matthew, and Vanessa Sperandio. 2006b. 'Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 74: 5445-55.
- Walters, Matthew, and Vanessa Sperandio. 2006c. 'Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*', *International Journal of Medical Microbiology*, 296: 125-31.
- Wang, F., B. T. Schwarz, W. V. Graham, Y. Wang, L. Su, D. R. Clayburgh, . . . J. R. Turner. 2006. 'IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction', *Gastroenterology*, 131: 1153-63.
- Wang, Fengjun, W. Vallen Graham, Yingmin Wang, Edwina D. Witkowski, Brad T. Schwarz, and Jerrold R. Turner. 2005. 'Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression', *The American Journal of Pathology*, 166: 409-19.
- Wang, G., S. Huang, Y. Wang, S. Cai, H. Yu, H. Liu, . . . S. Qiao. 2019. 'Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites', *Cell Mol Life Sci*, 76: 3917-37.
- Wang, XD, P AJ de Boer, and Lawrence I Rothfield. 1991. 'A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*', *The EMBO Journal*, 10: 3363-72.
- Waters, Christopher M, and Bonnie L Bassler. 2006. 'The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers', *Genes & Development*, 20: 2754-67.
- Weber, C. R., D. R. Raleigh, L. Su, L. Shen, E. A. Sullivan, Y. Wang, and J. R. Turner. 2010. 'Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity', *J Biol Chem*, 285: 12037-46.
- Wehkamp, J., J. Harder, M. Weichenthal, M. Schwab, E. Schaffeler, M. Schlee, . . . E. F. Stange. 2004. 'NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression', *Gut*, 53: 1658-64.
- Wehkamp, J., N. H. Salzman, E. Porter, S. Nuding, M. Weichenthal, R. E. Petras, . . . C. L. Bevins. 2005. 'Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 18129-34.
- Wehkamp, Jan, Klaus Fellermann, Klaus R. Herrlinger, Steffi Baxmann, Klaus Schmidt, Bettina Schwind, . . . Eduard F. Stange. 2002. 'Human β -defensin 2 but not β -defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease', *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 14: 745-52.

- Wehkamp, Jan, Juergen Harder, Michael Weichenthal, Oliver Mueller, Klaus R. Herrlinger, Klaus Fellermann, . . . Eduard F. Stange. 2003. 'Inducible and Constitutive β -Defensins Are Differentially Expressed in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis', *Inflammatory bowel diseases*, 9: 215-23.
- Weinstein, Robert A., Robert Gaynes, Jonathan R. Edwards, and National Nosocomial Infections Surveillance System. 2005. 'Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli', *Clinical Infectious Diseases*, 41: 848-54.
- Williams, S. C., E. K. Patterson, N. L. Carty, J. A. Griswold, A. N. Hamood, and K. P. Rumbaugh. 2004. 'Pseudomonas aeruginosa autoinducer enters and functions in mammalian cells', *J Bacteriol*, 186: 2281-7.
- Wine, Eytan, Juan C. Ossa, Scott D. Gray-Owen, and Philip M. Sherman. 2009. 'Adherent-invasive Escherichia coli, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia', *BMC microbiology*, 9: 180.
- Winer, Daniel A., Shawn Winer, Helen J. Dranse, and Tony K. T. Lam. 2017. 'Immunologic impact of the intestine in metabolic disease', *The Journal of Clinical Investigation*, 127: 33-42.
- Winson, Michael K, Miguel Camara, Amel Latifi, Maryline Foglino, Siri Ram Chhabra, Mavis Daykin, . . . Barrie W Bycroft. 1995. 'Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in Pseudomonas aeruginosa', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 9427-31.
- Wisner, D. M., L. R. Harris, 3rd, C. L. Green, and L. S. Poritz. 2008. 'Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon-gamma and interleukin-4', *J Surg Res*, 144: 1-7.
- Wong, Vivian. 1997. 'Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 273: C1859-C67.
- Wu, Zhengyang, Pia Nybom, and Karl-Eric Magnusson. 2000. 'Distinct effects of Vibrio cholerae haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1', *Cellular Microbiology*, 2: 11-17.
- Xavier, R. J., and D. K. Podolsky. 2007. 'Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease', *Nature*, 448: 427-34.
- Xing, Tiaosi, Rolando Camacho Salazar, and Yan-Hua Chen. 2017. 'Animal models for studying epithelial barriers in neonatal necrotizing enterocolitis, inflammatory bowel disease and colorectal cancer', *Tissue Barriers*: e1356901.
- Xu, J., P. J. Kausalya, D. C. Phua, S. M. Ali, Z. Hossain, and W. Hunziker. 2008. 'Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development', *Mol Cell Biol*, 28: 1669-78.
- Yamada, Hiroshi, Masahiko Yoneda, Shingo Inaguma, Daisuke Watanabe, Shogo Banno, Kazuhiro Yoshikawa, . . . Masahiro Zako. 2013. 'Infliximab counteracts tumor necrosis factor- α -enhanced induction of matrix metalloproteinases that degrade claudin and occludin in non-pigmented ciliary epithelium', *Biochemical Pharmacology*, 85: 1770-82.
- Yamaki, T., Y. Kamiya, K. Ohtake, M. Uchida, T. Seki, H. Ueda, . . . H. Natsume. 2014. 'A mechanism enhancing macromolecule transport through paracellular spaces induced by Poly-L-Arginine: Poly-L-Arginine induces the internalization of tight junction proteins via clathrin-mediated endocytosis', *Pharm Res*, 31: 2287-96.
- Yan, Hui, and Kolapo M. Ajuwon. 2017. 'Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway', *PloS one*, 12: e0179586-e86.
- Yano, Tomoki, Takeshi Matsui, Atsushi Tamura, Masami Uji, and Sachiko Tsukita. 2013. 'The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK', *J Cell Biol*, 203: 605-14.
- Yao, Yong, Maria A. Martinez-Yamout, Tobin J. Dickerson, Andrew P. Brogan, Peter E. Wright, and H. Jane Dyson. 2006. 'Structure of the Escherichia coli Quorum Sensing Protein SdiA: Activation of the Folding Switch by Acyl Homoserine Lactones', *Journal of Molecular Biology*, 355: 262-73.
- Yoon, Sang Sun, Robert F. Hennigan, George M. Hilliard, Urs A. Ochsner, Kislay Parvatiyar, Moneesha C. Kamani, . . . Daniel J. Hassett. 2002. 'Pseudomonas aeruginosa Anaerobic

- Respiration in Biofilms: Relationships to Cystic Fibrosis Pathogenesis', *Developmental cell*, 3: 593-603.
- Young, B., J. S. Lowe, A. Stevens, Philip J. Deakin, J.W. Heath, and P.R. Wheeler. 2000. *Wheater's functional histology : a text and colour atlas* (Churchill Livingstone, Edinburgh).
- Yu, M., Q. Wang, Y. Ma, L. Li, K. Yu, Z. Zhang, . . . H. Yang. 2018. 'Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Modulates Intestinal Epithelial Barrier Function by Maintaining Tight Junction Integrity', *Int J Biol Sci*, 14: 69-77.
- Zeissig, S, N Bürgel, D Günzel, J Richter, J Mankertz, U Wahnschaffe, . . . J-D Schulzke. 2007. 'Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease', *Gut*, 56: 61-72.
- Zeissig, S., C. Bojarski, N. Bürgel, J. Mankertz, M. Zeitz, M. Fromm, and J. D. Schulzke. 2004. 'Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor α antibody treatment', *Gut*, 53: 1295-302.
- Zelante, Teresa, Rossana G Iannitti, Cristina Cunha, Antonella De Luca, Gloria Giovannini, Giuseppe Pieraccini, . . . Luigina Romani. 2013. 'Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22', *Immunity*, 39: 372-85.
- Zeller, P., T. Bricks, G. Vidal, S. Jacques, P. M. Anton, and E. Leclerc. 2015. 'Multiparametric temporal analysis of the Caco-2/TC7 demonstrated functional and differentiated monolayers as early as 14 days of culture', *Eur J Pharm Sci*, 72: 1-11.
- Zemanick, E. T., S. D. Sagel, and J. K. Harris. 2011. 'The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment', *Curr Opin Pediatr*, 23: 319-24.
- Zhang, Chao, Li-wei Liu, Wen-jia Sun, Sheng-hui Qin, Ling-zhi Qin, and Xi Wang. 2015. 'Expressions of E-cadherin, p120ctn, β -catenin and NF- κ B in ulcerative colitis', *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 35: 368-73.
- Zhang, Li, Si Ming Man, Andrew S. Day, Steven T. Leach, Daniel A. Lemberg, Shoma Dutt, . . . Hazel Mitchell. 2009. 'Detection and Isolation of Campylobacter Species Other than *C. jejuni* from Children with Crohn's Disease', *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 453-55.
- Zhao, Guoping, Aaron M. Neely, Christian Schwarzer, Huayi Lu, Aaron G. Whitt, Nicole S. Stivers, . . . Chi Li. 2016. 'N-(3-oxo-acyl) homoserine lactone inhibits tumor growth independent of Bcl-2 proteins', *Oncotarget*, 7.
- Zhao, J., R. Zhao, L. Cheng, J. Yang, and L. Zhu. 2018. 'Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes intestinal barrier function by improving mucus and tight junctions in a mouse colitis model', *Dig Liver Dis*, 50: 1195-204.
- Zheng, A., F. Yuan, Y. Li, F. Zhu, P. Hou, J. Li, . . . H. Deng. 2007. 'Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus', *J Virol*, 81: 12465-71.
- Zhu, Jun, and John J Mekalanos. 2003. 'Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*', *Developmental cell*, 5: 647-56.
- Zhu, Jun, Melissa B. Miller, Russell E. Vance, Michelle Dziejman, Bonnie L. Bassler, and John J. Mekalanos. 2002. 'Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 3129-34.
- Ziegler, N., K. Awwad, B. Fisslthaler, M. Reis, K. Devraj, M. Corada, . . . S. Liebner. 2016. 'beta-Catenin Is Required for Endothelial Cyp1b1 Regulation Influencing Metabolic Barrier Function', *J Neurosci*, 36: 8921-35.
- Ziesche, L., L. Wolter, H. Wang, T. Brinkhoff, M. Pohlner, B. Engelen, . . . S. Schulz. 2018. 'An Unprecedented Medium-Chain Diunsaturated N-acylhomoserine Lactone from Marine Roseobacter Group Bacteria', *Mar Drugs*, 17.
- Ziesche, Lisa, Hilke Bruns, Marco Dogs, Laura Wolter, Florian Mann, Irene Wagner-Döbler, . . . Stefan Schulz. 2015. 'Homoserine Lactones, Methyl Oligohydroxybutyrates, and Other Extracellular Metabolites of Macroalgae-Associated Bacteria of the Roseobacter Clade: Identification and Functions', *ChemBioChem*, 16: 2094-107.
- Zihni, C., M. S. Balda, and K. Matter. 2014. 'Signalling at tight junctions during epithelial differentiation and microbial pathogenesis', *J Cell Sci*, 127: 3401-13.
- Zihni, Ceniz, Clare Mills, Karl Matter, and Maria S Balda. 2016. 'Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zimmermann, Sabine, Christof Wagner, Wencke Müller, Gerald Brenner-Weiss, Friederike Hug, Birgit Prior, . . . Gertrud Maria Hänsch. 2006. 'Induction of Neutrophil Chemotaxis by the Quorum-Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone', *Infection and Immunity*, 74: 5687-92.
- Zyrek, Agata A., Christoph Cichon, Simone Helms, Corinne Enders, Ulrich Sonnenborn, and M. Alexander Schmidt. 2007. 'Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair', *Cellular Microbiology*, 9: 804-16.

Lien vers la conférence TED de Bonnie Bassler de 2009 :

https://www.ted.com/talks/bonnie_bassler_how_bacteria_talk?utm_campaign=tedsread&utm_medium=referral&utm_source=tedcomshare.

Lien vers la conférence Bonnie Bassler de 2014 : <https://www.youtube.com/watch?v=q2nWNZ-gixI&feature=youtu.be>

ANNEXES

Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes

Laurent Genser^{1,2}, Doriane Aguanno³, Hédi A Soula³, Liping Dong³, Laurence Trystram⁴, Karen Assmann¹, Joe-Elie Salem⁵, Jean-Christophe Vaillant², Jean-Michel Oppert⁶, Fabienne Laugerette⁷, Marie-Caroline Michalski⁷, Philippe Wind⁸, Monique Rousset³, Edith Brot-Laroche³, Armelle Leturque³, Karine Clément^{1,6}, Sophie Thenet^{3,*†} and Christine Poitou^{1,6†}

¹ Sorbonne Université, INSERM, Nutriomics Team, Paris, France

² Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Department of Hepato-Biliary and Pancreatic Surgery, Paris, France

³ Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, EPHE, PSL University, Sorbonne Cités, UPD Univ Paris 05, INSERM, CNRS, Paris, France

⁴ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Department of Functional Coprology, Paris, France

⁵ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Department of Pharmacology and CIC-1421, Paris, France

⁶ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Nutrition Department, CRNH Ile de France, Paris, France

⁷ Lyon University, CarMeN laboratory, INRA U1397, Univ Lyon-1, INSERM U1060, INSA Lyon, Villeurbanne, France

⁸ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Avicenne Hospital, Department of Digestive and Metabolic Surgery, Université Paris XIII-UFR SMBH 'Léonard de Vinci', Bobigny, France

*Correspondence to: Sophie Thenet, EPHE, PSL University, Centre de Recherche des Cordeliers, UMR_S 1138 Team Intestine: Nutrition, Barrier and Diseases, 15 Rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France.

E-mail: sophie.thenet@ephe.psl.eu

†These authors contributed equally to this work.

Abstract

Obesity and its metabolic complications are characterized by subclinical systemic and tissue inflammation. In rodent models of obesity, inflammation and metabolic impairments are linked with intestinal barrier damage. However, whether intestinal permeability is altered in human obesity remains to be investigated. In a cohort of 122 severely obese and non-obese patients, we analyzed intestinal barrier function combining *in vivo* and *ex vivo* investigations. We found tight junction impairments in the jejunal epithelium of obese patients, evidenced by a reduction of occludin and tricellulin. Serum levels of zonulin and LPS binding protein, two markers usually associated with intestinal barrier alterations, were also increased in obese patients. Intestinal permeability *per se* was assessed *in vivo* by quantification of urinary lactitol/mannitol (L/M) and measured directly *ex vivo* on jejunal samples in Ussing chambers. In the fasting condition, L/M ratio and jejunal permeability were not significantly different between obese and non-obese patients, but high jejunal permeability to small molecules (0.4 kDa) was associated with systemic inflammation within the obese cohort. Altogether, these results suggest that intestinal barrier function is subtly compromised in obese patients. We thus tested whether this barrier impairment could be exacerbated by dietary lipids. To this end, we challenged jejunal samples with lipid micelles and showed that a single exposure increased permeability to macromolecules (4 kDa). Jejunal permeability after the lipid load was two-fold higher in obese patients compared to non-obese controls and correlated with systemic and intestinal inflammation. Moreover, lipid-induced permeability was an explicative variable of type 2 diabetes. In conclusion, intestinal barrier defects are present in human severe obesity and exacerbated by a lipid challenge. This paves the way to the development of novel therapeutic approaches to modulate intestinal barrier function or personalize nutrition therapy to decrease lipid-induced jejunal leakage in metabolic diseases.

Copyright © 2018 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: intestinal permeability; intestinal barrier function; obesity; jejunum; tight junction proteins; lipids; inflammation; type 2 diabetes; Ussing chamber

Received 22 February 2018; Revised 19 June 2018; Accepted 28 June 2018

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Intestinal barrier impairment is associated with local and systemic inflammation in inflammatory bowel diseases [1,2]. Barrier defects, including increased epithelial permeability, may promote the transfer of

dietary and bacterial antigens across the intestinal mucosa, thereby contributing to imbalanced responses of mucosal immune cells and induction of inflammation [3]. In return, pro-inflammatory cytokines are able to induce dysregulation of tight junctions involved in the control of paracellular flux, leading to a local

vicious cycle of inflammation [2,4]. In Crohn's disease, healthy first-degree relatives of patients display higher intestinal permeability than unrelated controls, suggesting that intestinal barrier defects could be early events contributing to disease pathogenesis [3]. This 'leaky gut' concept has been extended to extra-digestive diseases also associated with perturbed inflammatory responses, such as HIV/AIDS and type 1 diabetes [1,2].

Obesity and associated metabolic disorders, such as type 2 diabetes, are also characterized by systemic inflammation but at subclinical levels [5,6]. These metabolic diseases are associated with tissue inflammation in the liver [7], adipose tissue [8,9], and the small intestine, for which we recently demonstrated a link between activated intestinal T cells and impaired insulin signaling in enterocytes [10]. These results denote the importance of intestinal inflammation in the pathogenesis of obesity-related metabolic alterations. In this context, relationships with intestinal barrier dysfunction must be addressed in depth.

In mice, increased gut permeability has been linked to inflammation and metabolic alterations by the pioneering work of Cani [11]. These results were confirmed in multiple studies using rodent models of high-fat diet-induced obesity [12]. It has been proposed that endotoxemia, i.e. the passage of bacterial LPS into the systemic circulation, is a consequence of an altered intestinal barrier and plays a crucial role in the low-grade inflammation that is triggered by diet-induced obesity [13]. By contrast, only a few studies to date have investigated gut permeability in human obese patients. Based on the lactitol–mannitol intestinal permeability test performed in small cohorts, two studies showed an association between increased gut permeability and metabolic alterations such as insulin resistance and hepatic steatosis [14,15], while another one failed to show any disturbance of intestinal barrier function [16]. Similarly, analysis of endotoxemia gave rise to discordant results [17,18]. Thus, the impairment of intestinal barrier function in human obesity remains an open question, especially in severe obesity.

Excessive consumption of energy-dense foods has undoubtedly contributed to the obesity epidemic. In rodents, high-fat feeding is associated with changes in the gut microbial profile and decreased bacterial diversity [12], with similar findings described in human obesity [12,19]. In mice, changes in gut microbiota have been involved in the increase of intestinal permeability after 4 weeks of a high-fat diet (HFD), since effects were alleviated upon antibiotic treatments [11]. However, recent studies show that increased intestinal permeability is an early response to a HFD and precedes weight gain and the onset of type 2 diabetes [20–22]. Even though microbiota modifications could partly mediate barrier alterations [11], direct effects of dietary lipids on the intestinal epithelium must be considered. The hypothesis of short-term deleterious effects of lipids on the intestinal barrier is also supported by

the observation that a single lipid bolus can trigger postprandial endotoxemia in mice [23] and in humans [18,24,25]. It is currently acknowledged that endotoxemia reflects an increased intestinal permeability since LPS can cross an epithelial monolayer by the paracellular route [26]. However, postprandial endotoxemia can also result from the transcellular passage of LPS and its secretion in association with chylomicrons [23,25]. Therefore, postprandial endotoxemia does not necessarily reflect an increased intestinal permeability and the effects of lipids on the intestinal barrier remain to be elucidated.

The current study addresses in humans the relationships between obesity, alterations of intestinal permeability, endotoxemia, and systemic and intestinal inflammation, as well as metabolic alterations, in the fasting state and after a lipid challenge.

Materials and methods

Study population

A total of 78 severely obese candidates for Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) surgery were prospectively recruited at the Nutrition Department of Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France. Forty-two patients (54%) had type 2 diabetes, defined according to ADA criteria [27]. Among them, 29 (69%) were treated with metformin, 16 (38%) with sulfonylureas, 12 (29%) with GLP-1 agonists, and 14 (33%) with insulin. Jejunum samples were collected during RYGB. Jejunum characteristics (permeability and tight junction analysis) were compared with 14 non-obese controls (C1), which consisted of patients who underwent pancreaticoduodenectomy or gastrectomy, allowing access to proximal jejunal samples. Most importantly, we excluded non-obese patients with diabetes; renal-, cardiac- or hepatic failure; and patients with a personal or family history of inflammatory bowel disease or under treatment that could interfere with intestinal permeability (i.e. antibiotics, anti-inflammatory drugs, and chemotherapy). Their white blood count levels were under 10×10^9 per mm^3 and C-reactive protein (CRP) levels were below 5 mg/l.

For *in vivo* assays (i.e. L/M test, LPS transporters, and zonulin), an independent control group of 30 healthy patients (C2) and 28 obese patients were investigated. This subgroup of obese patients was not different from the rest of the cohort according to age and BMI (ANOVA statistical test with $p = 0.98$ and $p = 0.07$ for age and BMI, respectively).

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, received approval from the local ethics committee (CPP Ile de France I), and was registered on the ClinicalTrials.gov website (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02292121>). Informed written consent was obtained from all patients prior to study inclusion.

Clinical, anthropological, and biological characteristics

Medical history and clinical variables were recorded for the two groups of controls (C1 and C2) and for obese patients before surgery. The percentage of total fat mass was evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry (Hologic Discovery DXA System W; Hologic Inc, Bedford, MA, USA) in obese patients as previously described [28] and by bioimpedance in C2 patients. The percentage of visceral fat mass was measured in obese patients at the L4 spinal segment level using computed tomography. Venous blood samples were collected after a 12-h fast for routine assessment of biological metabolic and inflammatory variables as previously described [5]. Calprotectin is a cytoplasmic protein released from activated neutrophil granulocytes; in feces, it is considered a marker of intestinal inflammation. Fecal calprotectin was quantified using ELISA (Calprest[®], Eurospital, Trieste, Italy). The quantification limit of the assay is 15 µg/g of stool. Insulin resistance was assessed using the HOMA-IR index [insulinemia (mIU/l) × fasting blood glucose (mmol/l)/22.5]. Insulin and HOMA-IR were not considered for patients treated by insulin, GLP-1 agonists or sulfonylureas.

Serum levels of LPS binding protein (LBP), soluble CD14 (sCD14), and zonulin were measured using ELISA kits (respectively: R&D Systems, BioTechne, Lille, France; Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands; and Immundiagnostik) as previously described [18].

In vivo lactitol/mannitol urinary excretion ratio test

The lactitol/mannitol (L/M) urinary excretion test was performed during the month preceding the surgery. Patients were given a mannitol and lactitol mix in aqueous solution (4 g of each sugar in 40 ml of water) after a 12-h fast. The urine concentration of both sugars was determined as described in the supplementary material, Supplementary materials and methods, and expressed as the L/M ratio.

Tight junction analysis and *ex vivo* permeability assays in Ussing chambers

Proximal jejunum samples from obese and non-obese C1 patients were collected during surgery, conditioned, and transported as previously described [10].

The tight junction proteins occludin (catalog number #71-1500, dilution 1:200; Invitrogen[™], ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) and tricellulin (#700191, dilution 1:200; Invitrogen[™]) and Na K ATPase (#ab2871, dilution 1:500; Abcam, Paris, France) were analyzed by immunofluorescence in paraffin-embedded jejunum from obese and non-obese C1 patients, as described in the supplementary material, Supplementary material and methods. Occludin and tricellulin total levels were determined in jejunum samples using a WES capillary electrophoresis system (ProteinSimple, San José, CA, USA) as described in

the supplementary material, Supplementary material and methods.

For jejunal permeability assays in Ussing chambers, mucosa was dissected from the submucosa–muscle plane. Explants were mounted on inserts exposing 0.5 cm² of mucosa between Ussing chambers (World Precision Instruments, Hitchin, UK). Luminal and serosal chambers were filled with 2 ml of Dulbecco's Modified Eagle's Medium at 37 °C and saturated with 95% oxygen and 5% CO₂ gas flow. After equilibration for 30 min, fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled sulfonic acid (FITC-SA, 0.4 kDa, 500 µM; Invitrogen) or FITC-Dextran (4 kDa, 500 µM or 10 kDa, 200 µM; TdB Consultancy, Uppsala, Sweden) was added to the luminal chamber. Intestinal permeability was derived from serosal-chamber fluorescence values, measured at 15-min intervals from 60 to 105 min following addition of the fluorescent molecule, using a microplate fluorometer (BMG Labtech[®], Champigny-sur-Marne, France). Baseline permeability (i.e. measured in jejunum samples of fasting patients) was determined by the slope obtained by plotting the increase in fluorescence intensity over time, using a linear regression fit model (Microsoft Excel, Microsoft Office). The slope value was adjusted to the initial fluorescence intensity in each corresponding luminal reservoir. Permeability was calculated as the average values of at least three Ussing chambers per subject.

The impact of lipids on jejunal permeability was assessed by measuring permeability to FITC-Dextran 4 kDa in the same jejunal samples before and after addition of lipid micelles prepared as described in the supplementary material, Supplementary material and methods. After measuring baseline permeability up to 105 min, lipid micelles were added to the luminal chambers and fluorescence was monitored every 15 min until time point 180 min.

Permeability measurements in Caco-2/TC7 cells treated with lipid micelles

We used the TC7 clone of the human intestinal epithelial cell line Caco-2 as a recognized model of well-differentiated enterocytes [29]. Caco-2/TC7 cells were cultured on Transwell[®] filters (Corning, VWR International, Strasbourg, France). Lipid micelles, prepared as described in the supplementary material, Supplementary material and methods, were added to the apical medium on the last day of culture.

To assess paracellular permeability, FITC-labeled sulfonic acid (400 Da) or dextran tracers (4 or 10 kDa) were added to the apical medium. Samples of basal medium were collected at indicated times and fluorescence was determined (BMG Labtech[®]). Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured using a Millicell-ERS apparatus (Millipore, Molsheim, France).

Immunofluorescence analysis of tricellulin was performed as described in the supplementary material, Supplementary material and methods.

Table 1. Clinical and biological baseline characteristics of obese and non-obese (C1 and C2) patients enrolled in the present study

		C1 non-obese (n = 14)	C2 non-obese (n = 30)	Obese (n = 78)	P value*	
					C1 versus obese	C2 versus obese
Demographic data	Sex ratio M/F, n (%)	7 (50)/7 (50)	2 (7)/28 (93)	18 (23)/60 (77)	0.037	0.049
	Age (years)	60.1 ± 3 (30.8–71)	43 ± 2.2 (21.3–63.8)	42.6 ± 1.5 (21–67)	0.0003	0.18
Corpulence and adipokines	Weight (kg)	68.5 ± 3.5 (47–88)	60.7 ± 1.3 (48.5–85)	125.5 ± 2.3 (87.8–194)	< 0.0001	< 0.0001
	BMI (kg/m ²)	23.5 ± 0.9 (18.4–27.6)	22.5 ± 0.3 (18.8–24.9)	45.5 ± 0.6 (37–56.9)	< 0.0001	< 0.0001
	Fat mass (%) [†]	–	27.8 ± 1 (17–37)	47.3 ± 0.6 (27.4–56.9)	–	–
Comorbidities	Type 2 diabetes, n (%)	0	0	42 (53.8)	< 0.0001	< 0.0001
	Hypercholesterolemia, n (%)	2 (14.3)	0	36 (46.1)	0.026	< 0.0001
	Hypertriglyceridemia, n (%)	0	0	41 (52.6)	0.0003	0.0003
	OSA, n (%)	0	0	56 (71.8)	< 0.0001	< 0.0001
	Hypertension, n (%)	2 (14.3)	0	36 (46.1)	0.0258	< 0.0001
	Systolic blood pressure (mmHg)	127.4 ± 1.7 (123–136)	110.1 ± 1.8 (93–130)	120.8 ± 1.5 (100–157)	0.02	< 0.0001
	Diastolic blood pressure (mmHg)	56.2 ± 3.5 (27–67)	71.2 ± 1.3 (61–88)	68 ± 1.3 (50–96)	0.004	0.025
Glucose metabolism	Glycemia (mmol/l)	–	4.6 ± 0.1 (3.8–5.1)	6.6 ± 2.2 (3.5–17.1)	–	< 0.0001
	Insulinemia (mU/l)*	–	6.3 ± 0.6 (2.2–18)	22.4 ± 2.2 (0.5–85.6)	–	< 0.0001
	HOMA-IR*	–	1.2 ± 0.1 (0.4–3.7)	5.8 ± 0.6 (0.1–25.1)	–	< 0.0001
Lipid metabolism	Total cholesterol (mmol/l)	–	4.9 ± 0.2 (3.3–6.7)	4.7 ± 0.1 (3.1–7.2)	–	0.23
	Triglycerides (mmol/l)	–	0.9 ± 0.3 (0.3–1.8)	1.7 ± 0.1 (0.5–6.2)	–	< 0.0001
	HDL (mmol/l)	–	1.6 ± 0.1 (0.8–2.4)	1 ± 0.1 (0.6–1.8)	–	< 0.0001
	LDL (mmol/l)	–	2.9 ± 0.1 (1.3–4.3)	2.9 ± 0.1 (1.3–5.3)	–	0.88

Mean ± SEM (min–max); non-parametric unpaired Mann–Whitney test (quantitative variables); chi-square test (categorical variables). DXA = dual-energy X-ray absorptiometry; OSA = obstructive sleep apnea syndrome.

*Data not considered in 29 diabetic obese patients treated with sulfonylureas and/or insulin and/or GLP-1 agonists.

[†]% of fat mass was measured by impedance for non-obese and DEXA for obese patients.

Statistics

Data are displayed as means ± standard error of the mean (SEM) unless otherwise indicated. We used a generalized linear model (GLM) with binomial family classification for categorical variables and Gaussian family classification for quantitative variables, adjusting for age, sex, and BMI (age and sex only when comparing obese and non-obese patients). The relevant *P* values were obtained using ANOVA on the full models. Partial correlation (Pearson's family) including correction for age, sex, and BMI was used to determine correlation of *in vivo* and *ex vivo* intestinal parameters with clinical data and biological parameters. GLM and partial correlation were computed using R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), using the *glm* and *ANOVA* functions in the 'car' package for GLM and the *pcor.test* in the 'RVAideMemoire' package for partial correlation. For inflammation parameters, principal component analysis (PCA) was performed to avoid multiple testing and to detect relevant variables. Kinetics experiments in Caco-2/TC7 cells were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Figures were created with Graphpad® Prism

6.0 (Ritme Informatique, Paris, France). *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Tight junctions are altered in the jejunum of severely obese patients

The characteristics of 122 patients included in the study are provided in Table 1. As expected, severely obese patients showed a high prevalence of comorbidities. They exhibited impaired metabolic parameters such as increased fasting glycemia, insulinemia, triglycerides, and decreased HDL-c values.

We evaluated the organization of tight junctions in the jejunum epithelium collected in the fasted state (supplementary material, Figure S1). The fluorescence intensity of occludin and tricellulin labeling in the respective bicellular and tricellular tight junctions were significantly decreased in obese patients compared with non-obese patients (Figure 1, occludin: –43%, *p* < 0.0001; tricellulin: –27%, *p* < 0.0001), without

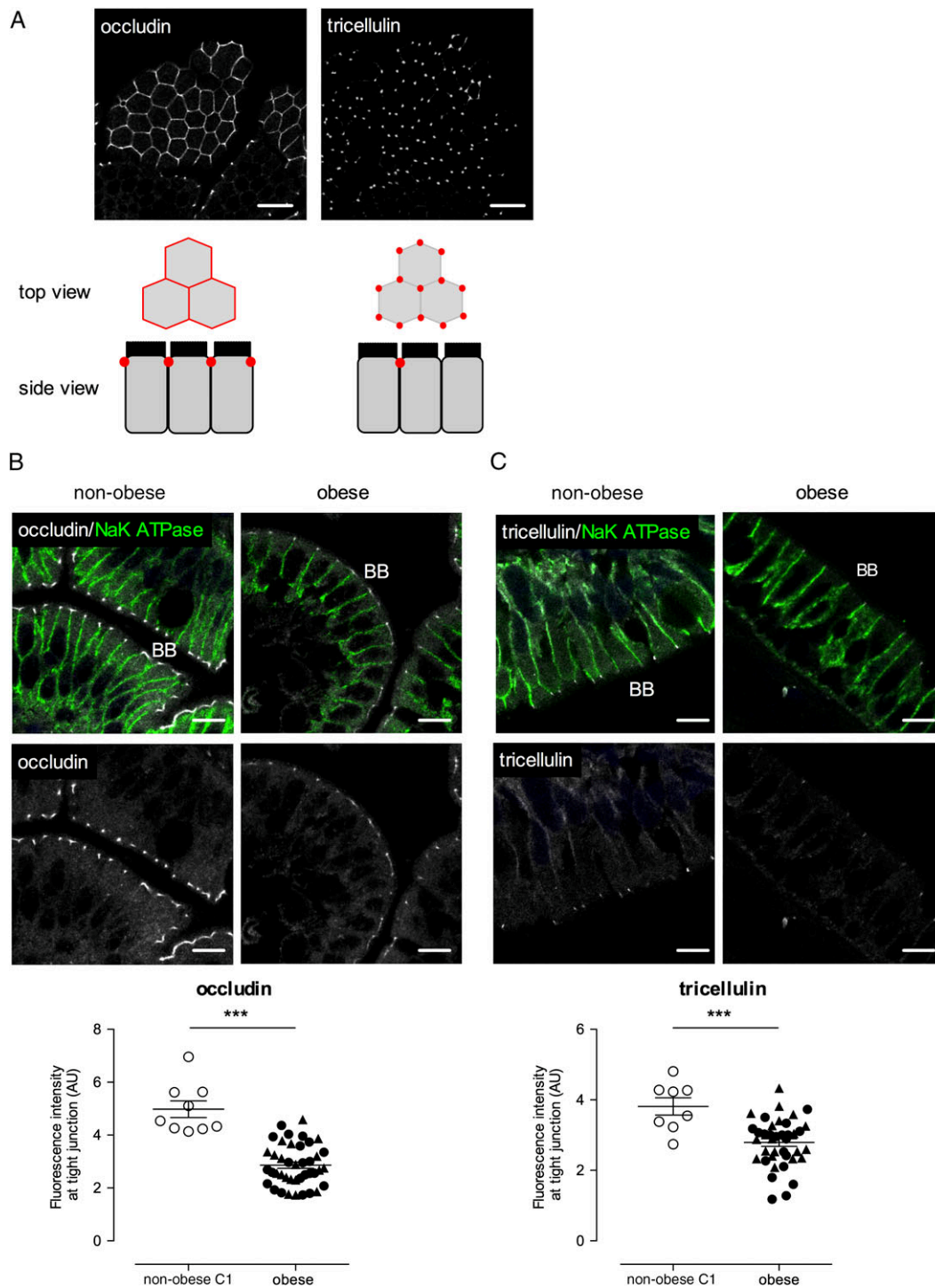


Figure 1. Decreased occludin and tricellulin at tight junctions in the jejunum of fasted obese patients. (A) Occludin and tricellulin were analyzed by immunofluorescence and confocal microscopy in jejunum sections. Photographs show their expected distributions at bicellular and tricellular tight junctions, respectively. The schemes display the labeling profile obtained with either top views (as shown in the photographs) or side views (shown in B and C and used for quantifications as described below). (B, C) Representative fields of the side views of occludin (B) and tricellulin (C) labeling (white), with Na K ATPase basolateral co-labeling (green). Scale bar = 10 μm; BB = brush border. Fluorescence intensity at the level of tight junction was quantified by ImageJ® (AU = arbitrary unit) as described in the supplementary material, Figure S1. For each subject, the value is the median fluorescence obtained by the measurement of ~200 tight junctions of the mid-villus from at least nine fields in tile images with correct orientation according to the Na K ATPase basolateral labeling. (B) Occludin, non-obese C1 (n = 9), obese (n = 41), ***p < 0.001. (C) Tricellulin, non-obese C1 (n = 8), obese (n = 39), ***p < 0.001. Obese patients include non-diabetic obese (black circles) and diabetic obese patients (black triangles). No significant difference was observed according to the presence of type 2 diabetes (p = 0.34 and p = 0.18 for occludin and tricellulin, respectively). Results are provided as dot plots with mean ± SEM; generalized linear model (GLM) corrected for age and sex.

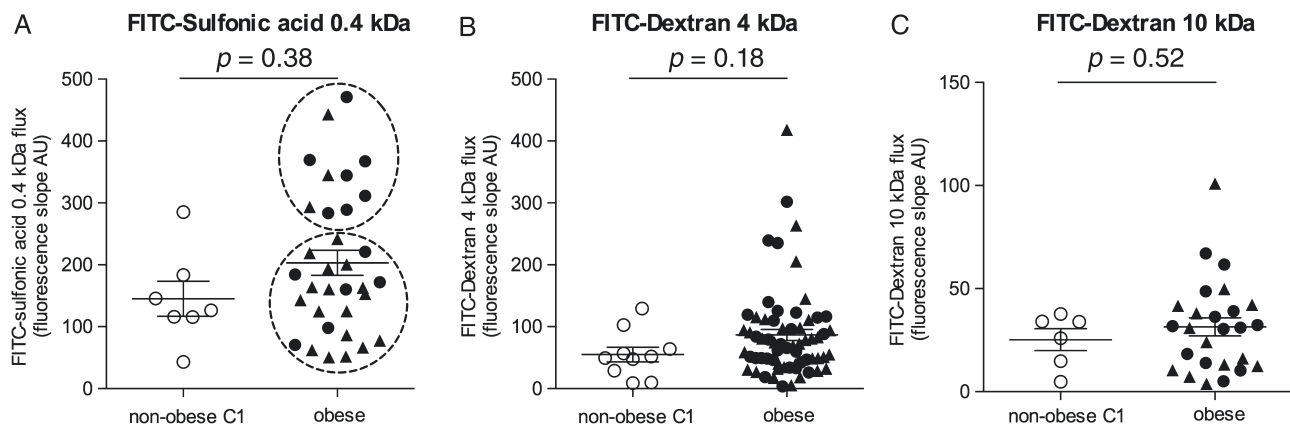


Figure 2. Jejunal permeability measured in Ussing chambers in obese and non-obese patients at fasting state. Jejunum samples were mounted in Ussing chambers to measure the permeability for (A) FITC-sulfonic acid 0.4 kDa, non-obese C1 ($n = 7$), obese ($n = 33$). Dotted circles delineate two subgroups according to the nadir in the distribution of permeability values (low versus high); (B) FITC-Dextran 4 kDa, non-obese C1 ($n = 10$), obese ($n = 65$); and (C) FITC-Dextran 10 kDa, non-obese C1 ($n = 6$), obese ($n = 26$). Obese patients include non-diabetic obese (black circles) and diabetic obese patients (black triangles). *Ex vivo* permeability was lower in diabetic obese (ObD) than in obese (Ob) patients for FITC-sulfonic acid 0.4 kDa [168.3 ± 23 AU in ObD ($n = 20$) versus 257.1 ± 32.6 AU in Ob ($n = 13$), $p = 0.01$] but was comparable when FITC-Dextran 4 kDa ($p = 0.85$) and 10 kDa ($p = 0.84$) were considered. Data, expressed as fluorescence slope in arbitrary units (AU), are provided as dot plots with mean \pm SEM; GLM corrected for age and sex.

modification in the total amount of these proteins (supplementary material, Figure S2). Contrariwise, ZO-1 was unchanged (data not shown).

Intestinal permeability is not increased in fasting obese patients but permeability to small molecules is linked to subclinical inflammation

To assess whether these tight junction impairments were associated with intestine barrier dysfunction, we performed an *ex vivo* measure of intestinal permeability in Ussing chambers using tracers of different molecular weights: 0.4 kDa (representative of disaccharides) and 4 or 10 kDa (representative of larger-size components such as dietary or bacterial molecules) [30]. For the three tracers, the distributions of the jejunal permeability values were more heterogeneous in obese patients than in the non-obese control group, but no significant difference was found (Figure 2A–C). In agreement with these *ex vivo* data, urinary L/M ratios were not statistically different between obese and non-obese patients (Figure 3A).

We examined a series of serum markers that have been shown to be associated with impaired barrier function. Fasting serum levels of zonulin and lipopolysaccharide binding protein (LBP) were increased in obese patients (+13%, $p = 0.03$ and +25%, $p < 0.0001$, respectively; Figure 3B, C). Soluble CD14 (sCD14), another LPS co-receptor, was comparable between obese and non-obese groups (Figure 3D).

No difference between diabetic and non-diabetic obese patients was observed, regardless of the method of intestinal barrier evaluation considered (Figures 1–3). We did not find any relevant relationship between the permeability parameters and anti-diabetic treatments (supplementary material, Table S1). Moreover, none of the *in vivo* markers of intestinal permeability or altered

barrier function was correlated with the values obtained by direct measurement of jejunal permeability in Ussing chambers (supplementary material, Table S2).

Taking advantage of the heterogeneous distribution in jejunal permeability to FITC-SA 0.4 kDa and FITC-Dextran 4 kDa within the obese group, we analyzed whether links could be found between intestinal permeability and subclinical inflammation. Indeed, patients with severe obesity displayed varying levels of systemic low-grade inflammation markers (Table 2) and of fecal calprotectin, a surrogate marker of the intestinal micro-inflammation (Figure 3E). Using partial correlation analysis, we examined the relationships between different parameters of barrier function and a large set of clinical and biological markers (supplementary material, Table S3). Several positive correlations were found between permeability values measured in Ussing chambers and inflammation markers. Permeability to the 0.4 kDa tracer was positively correlated with haptoglobin ($\rho = 0.65$; $p < 0.001$) and CRP ($\rho = 0.47$; $p = 0.009$) (Figure 4A). The distribution of the jejunal permeability values allowed the delineation of two groups with low or high permeability to the 0.4 kDa tracer (Figure 2A). To assess further the link between inflammation and permeability, we performed principal component analysis (PCA) including six different serum markers of inflammation (Table 2) and fecal calprotectin. The first two principal components suggest an important impact of only three markers – CRP, haptoglobin, and fibrinogen – which drive the clustering of patients as a function of their jejunal permeability (Figure 4B). Taking into account each marker individually, we confirmed higher levels of haptoglobin and CRP in the high permeability group ($p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively; Figure 4C) but no statistical difference was observed for fibrinogen levels ($p = 0.12$). No link was observed between inflammation and permeability

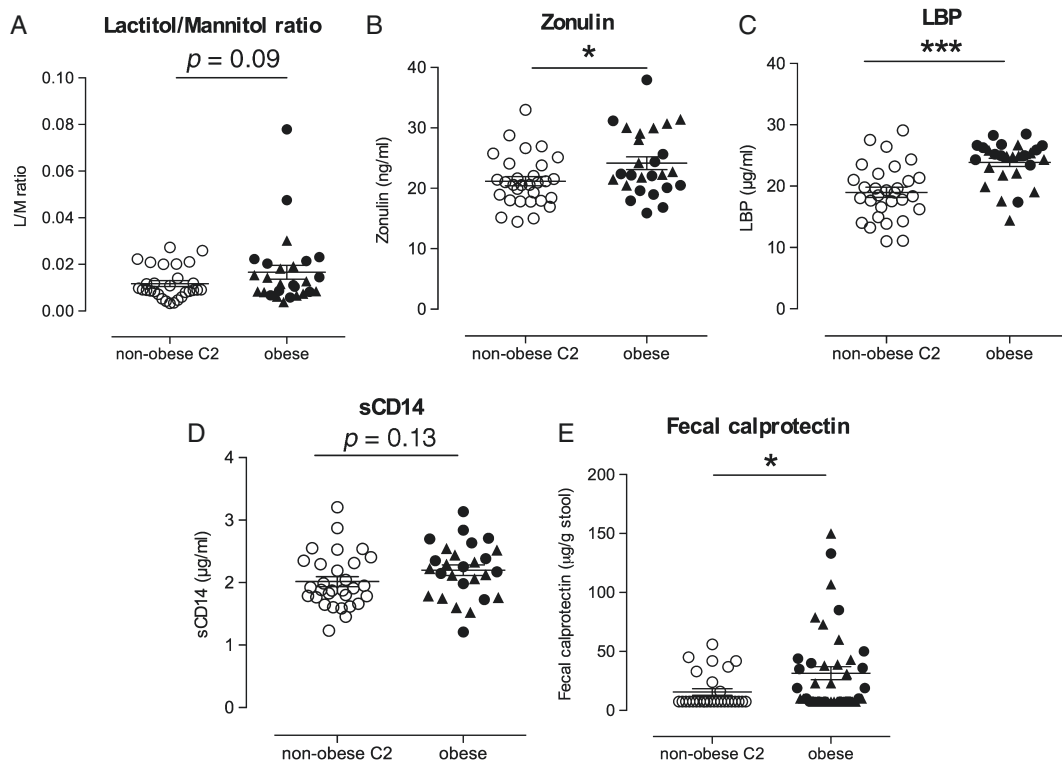


Figure 3. Lactitol/mannitol (L/M) excretion ratio, zonulin serum levels, endotoxemia-related parameters, and fecal calprotectin in obese and non-obese patients at fasting state. (A) L/M urinary excretion ratio in non-obese C2 ($n = 29$) and obese patients ($n = 27$). (B) Zonulin serum level (ng/ml) in non-obese C2 ($n = 30$) and obese patients ($n = 26$). $*p < 0.05$. (C, D) Serum levels of LBP (µg/ml) and sCD14 (µg/ml) in non-obese C2 ($n = 30$) and obese patients ($n = 27$). $***p < 0.001$. (E) Fecal calprotectin concentration (µg/g of stool) in non-obese C2 ($n = 29$) and obese patients ($n = 41$). $*p < 0.05$. Obese patients include non-diabetic obese (black circles) and diabetic obese patients (black triangles). No differences between Ob and ObD patients were observed for any of these parameters (L/M ratio, $p = 0.46$; zonulin, $p = 0.39$; LBP, $p = 0.08$; sCD14, $p = 0.34$; fecal calprotectin, $p = 0.6$). Results are provided as dot plots with mean \pm SEM; GLM corrected for age and sex.

Table 2. Inflammation markers, adipokines, and metabolic parameters in obese patients

		Obese ($n = 78$)
Low-grade inflammation	CRP (mg/l)	8 ± 1 (0.8–58)
	Orosomucoid (mg/l)	0.9 ± 0.1 (0.2–2.2)
	Haptoglobin (mg/l)	1.8 ± 0.1 (0.6–4)
	IL-6 plasma (pg/ml)	6.9 ± 1.9 (1.4–130.8)
	Fibrinogen (g/l)	4.5 ± 0.1 (2.9–6.2)
	Leucocytes ($\times 10^3$ per mm^3)	7.3 ± 0.2 (4–11.7)
Adipokines	Adiponectin (µg/ml)	4.1 ± 0.2 (1.7–11.3)
	Leptin (ng/ml)	61 ± 3.5 (15–164.1)
Metabolic parameters	Visceral fat mass (%)	30.9 ± 2.7 (9.2–75.6)
	HbA1c (%)	6.8 ± 0.1 (5.1–10.6)

Mean \pm SEM (min–max).

to large molecules (FITC-Dextran 4 kDa) or L/M ratio. Regarding serum biomarkers of altered barrier function, the only correlation with inflammation was found for LBP, whose level was positively correlated with the fibrinogen level (Figure 4A and supplementary material, Table S3).

To summarize, no statistical difference was found between fasted obese and non-obese patients concerning

their intestinal permeability measured either *in vivo* by the L/M test or directly in Ussing chambers. However, altered tight junctions, increased serum levels of two potential markers of altered barrier function (zonulin and LBP), as well as an association between jejunal permeability and inflammation suggested that the intestinal barrier function is weakened in severe obesity.

Increased jejunal permeability to large molecules is revealed by a lipid challenge and is linked with inflammation and type 2 diabetes

We hypothesized that the subtle impairment of the intestinal barrier observed in the fasting state could be exacerbated by a lipid challenge mimicking a meal.

In a first step, we aimed to test whether dietary lipids exert direct effects on intestinal permeability. For this purpose, we exposed the Caco-2/TC7 human intestinal cells to lipid micelles with a composition reflecting that of micelles in the intestinal lumen after a lipid-rich meal [31]. Whereas transepithelial electrical resistance (TEER) was not modified (supplementary material, Figure S3A), lipid micelles significantly increased Caco-2/TC7 permeability to different tracers, with a stronger effect on permeability to large-size molecules (≥ 4 kDa), compared with small-size molecules (0.4 kDa) (Figure 5A). This increased permeability

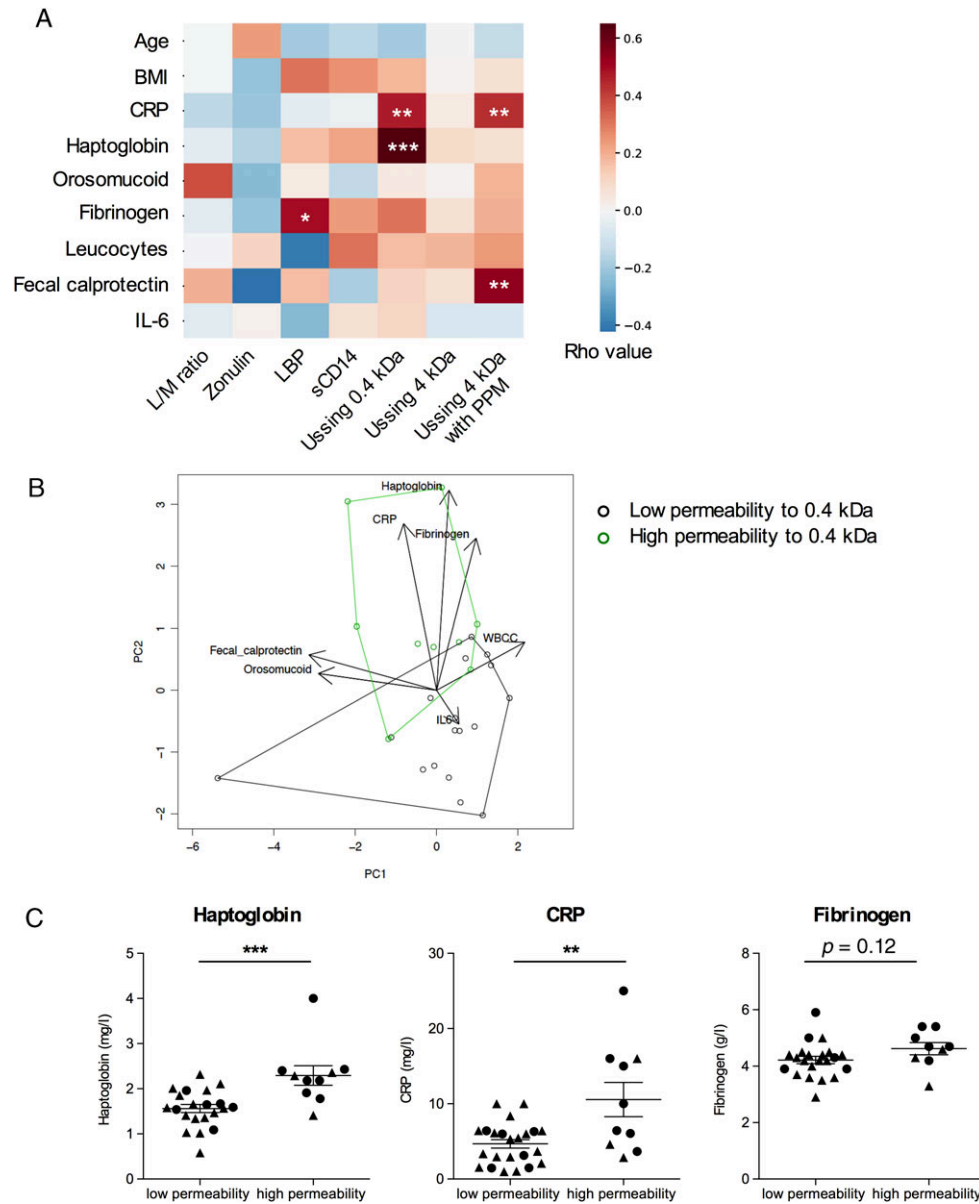


Figure 4. Obesity-related phenotype and jejunal permeability relationships. (A) Heat map of correlations between parameters of intestinal barrier function (evaluated either by the L/M ratio; serum levels of zonulin, LBP or sCD14; or permeability measured directly in Ussing chambers) with baseline obesity-related clinical parameters adjusted for age, sex, and BMI (partial Pearson correlations). Each colored square denotes a correlation at the intersection of columns and lines. Color intensity (color key) indicates the correlation coefficient magnitude, using the red color for positive correlation and blue for negative correlation. Significant P values are indicated for each intersection: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Detailed rho, P , and n values are presented in the supplementary material, Table S3. PPM = postprandial micelles. (B) Biplot from the PCA of the inflammation markers. Vectors corresponding to the seven inflammation markers are displayed, and subgroups with low (black) and high permeability (green) to the 0.4 kDa tracer, determined according to Figure 2A, are delineated using the convex hull. (C) Serum levels of haptoglobin, CRP, and fibrinogen according to permeability to the 0.4 kDa tracer (low or high, see Figure 2A). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Obese patients include non-diabetic obese (black circles) and diabetic obese patients (black triangles). Results are provided as dot plots with mean \pm SEM; GLM corrected for age, sex, and BMI.

was associated with a decreased intensity of tricellulin staining (Figure 5B). Micelles containing digestion products of triglycerides ('postprandial micelles') significantly increased paracellular permeability, but micelles containing only biliary products ('interprandial micelles') had no effect (Figure 5A), nor did taurocholic acid or a combination of taurocholic acid and oleic acid (supplementary material, Figure S3B).

We then evaluated the effect of such an *ex vivo* lipid challenge on the permeability of human jejunum

samples. As lipids impacted mostly permeability to macromolecules in Caco-2/TC7 cells, we focused on the passage of FITC-Dextran 4 kDa, which was measured before and after the addition of postprandial micelles in the luminal reservoir of Ussing chambers. When considering all patients, including non-obese and obese, lipid micelles significantly increased the passage of FITC-Dextran 4 kDa (Figure 6A; $p < 0.001$). However, postprandial micelles had a potent effect in obese patients (89.9 ± 9.4 AU at baseline

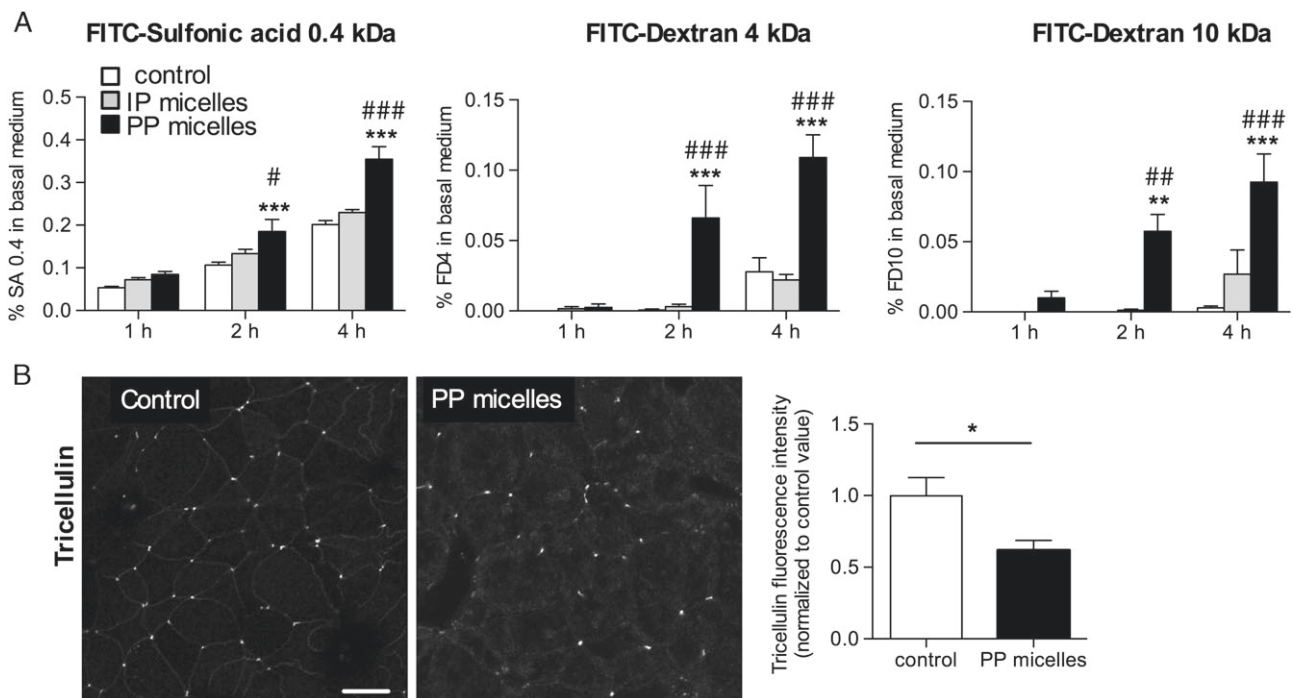


Figure 5. Lipid micelles increase permeability to macromolecules in Caco-2/TC7 enterocytes. Caco-2/TC7 cells were cultured on Transwell filters and exposed on their apical side to postprandial (PP) micelles or interprandial (IP) micelles. (A) Paracellular permeability was evaluated by the passage of FITC-sulfonic acid (0.4 kDa) or FITC-Dextran (4 or 10 kDa) from the apical to the basal side of the monolayer. Results are expressed as a percentage of the initial quantity of tracer in the apical compartment and are the mean \pm SEM of three to six replicates. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus control; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ versus IP micelles (two-way ANOVA; Tukey's *post hoc* test). One representative of two to four independent experiments is presented for each tracer. (B) Immunofluorescence analysis of tricellulin after exposure to PP micelles. Scale bar = 10 μ m. Fluorescence intensity was quantified using Fiji on 30 different fields from four independent experiments.

versus 151.2 ± 15.9 AU with micelles; mean fold increase +68%, $p < 0.0001$) and a lower impact in non-obese patients (54.1 ± 16.6 AU at baseline versus 78.5 ± 17.2 AU with micelles; mean fold increase +45%, $p < 0.001$). Strikingly, the permeability to FITC-Dextran 4 kDa after the lipid challenge was 1.9-fold higher in obese than in non-obese patients (Figure 6B; $p = 0.03$). Exposing obese patients' jejunal explants to lipid micelles resulted in a significant decrease in tricellulin fluorescence intensity (-17%), compared with control explants without micelles (Figure 6C; $p = 0.012$).

In the obese patients, *ex vivo* jejunal permeability to FITC-Dextran 4 kDa after the micelle challenge showed a positive correlation with markers of systemic (CRP $\rho = 0.44$; $p = 0.010$) and intestinal inflammation (fecal calprotectin $\rho = 0.53$; $p = 0.007$) (Figure 4A and supplementary material, Table S3). We used a generalized linear model to explain diabetic status taking into account age, sex, BMI, and permeability to FITC-Dextran 4 kDa at baseline and after lipid challenge. We found that age and jejunal permeability after lipid challenge were the only independent variables explaining diabetic status ($p = 0.008$ and $p = 0.013$ for age and permeability, respectively). When corrected for age, BMI, sex, and baseline permeability, permeability after micelles was significantly higher in diabetic obese than in non-diabetic obese patients (Figure 6D; $p = 0.012$). Thus, an increased permeability to large

molecules after a lipid challenge was linked to the diabetic status.

Discussion

Combining *ex vivo* and *in vivo* approaches, we demonstrate an alteration of the intestinal barrier function in human obesity evidenced by impaired tight junctions and increased levels of seric zonulin and LBP. Increased jejunal permeability was not detected in fasted obese patients but was unveiled after a challenge with dietary lipids and linked with inflammation and metabolic alteration.

Intestinal permeability is controlled by tight junctions, which are impaired in inflammatory bowel disease (IBD) [32,33]. Among the large repertoire of tight junction proteins, our study focused on tricellulin and occludin, two proteins involved in the barrier to macromolecules [34,35], the latter being found decreased in rodent models of genetic- or diet-induced obesity [11,36,37]. In our obese patients, total jejunal occludin and tricellulin were unchanged. However, their levels were decreased in tight junctions, demonstrating for the first time a mislocalization of both proteins in human obesity, as described in other inflammatory conditions [38,39]. This suggests that human obesity is associated with altered intestinal barrier properties. Contrary to

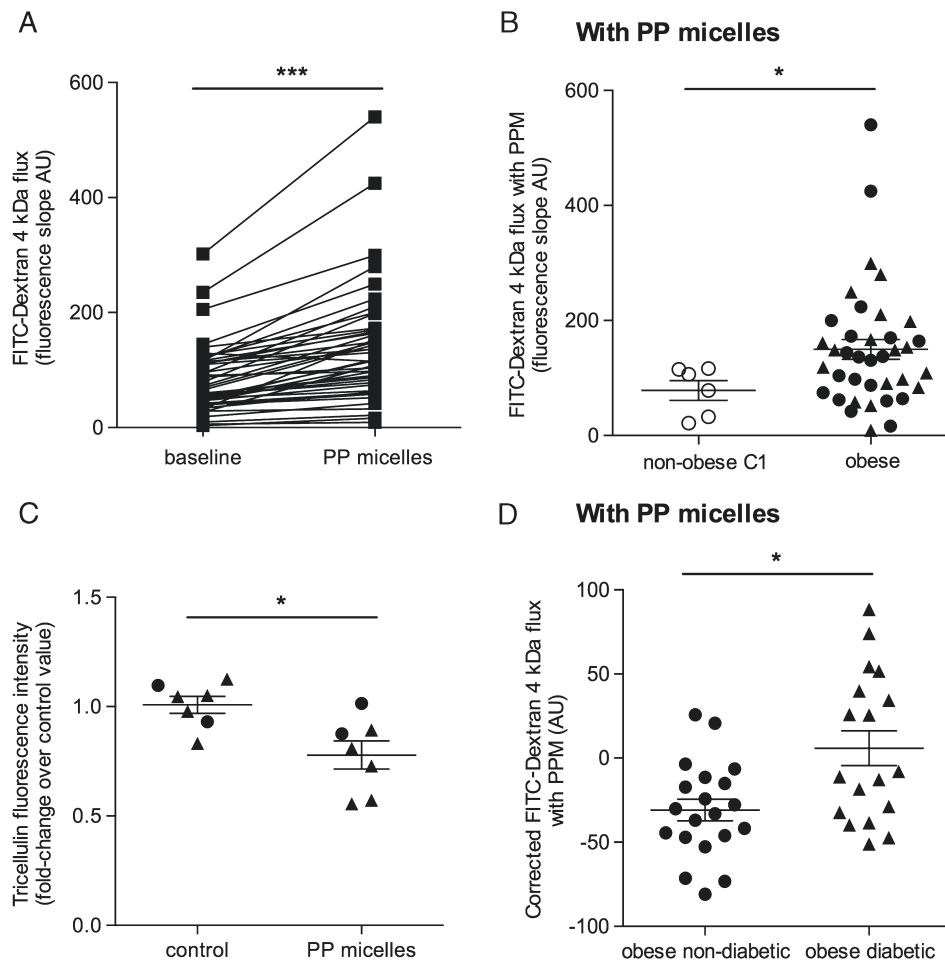


Figure 6. Lipid micelles reveal increased permeability to macromolecules in human jejunum from obese patients. (A) Jejunum samples mounted in Ussing chambers were analyzed for permeability to FITC-Dextran 4 kDa at baseline and after supply of PP micelles. Fluorescence slope values (AU) are presented for six non-obese C1 and 38 obese patients. GLM corrected for age and sex; *** $p < 0.001$. (B) Permeability to FITC-Dextran 4 kDa after exposure to PP micelles in non-obese C1 ($n = 6$) and obese patients ($n = 38$). Obese patients include non-diabetic obese (black circles) and diabetic obese patients (black triangles). GLM corrected for age, sex, and BMI; * $p < 0.05$. (C) Modification of tricellulin fluorescence intensity at tight junction in the presence of PP micelles in seven obese patients. For each patient, two equivalent jejunum samples were taken close to the mucosa sample used for jejunal permeability assessment in Ussing chambers and incubated in the presence or absence of PP micelles before fixation and immunolabeling. Non-parametric unpaired Mann-Whitney test. * $p < 0.05$. (D) Variation of FITC-Dextran 4 kDa flux after exposure to PP micelles according to type 2 diabetes status (GLM model: FITC-Dextran 4 kDa flux with PP micelles \sim age + BMI + sex + FITC-Dextran 4 kDa flux baseline + type 2 diabetes) in obese patients without (Ob, $n = 20$) or with type 2 diabetes (ObD, $n = 18$). * $p < 0.05$.

IBD [40], we did not observe any epithelial lesions (data not shown) and we assessed whether the modification of tight junctions in obese patients was sufficient to lead to increased permeability. Considered as the gold standard, the Ussing chamber method allows for direct assessment of permeability in specific intestinal segments, regardless of confounding factors (i.e. intestinal transit time and surface area, tracer degradation, renal function, etc), and has been used to characterize barrier alterations in several animal models [41]. Measured during the fasting state in obese individuals being operated on for bariatric surgery, jejunal permeability to small and large molecules was not significantly increased compared with non-obese patients. This result contrasts with obese mice fed a HFD, in which a two- to ten-fold increase in intestinal permeability to macromolecules was reported [11,20,21,42]. However, in our cohort, accurate analysis of phenotypes linked to obesity revealed associations

between jejunal permeability to small molecules and inflammation status. Thus, despite much more modest barrier defects compared with rodent models of obesity, our results demonstrate in humans the links between jejunal permeability and obesity-associated low-grade inflammation.

When evaluated in the fasting state, alterations of the intestinal barrier of obese patients were probably too subtle to be clearly evidenced in comparison to non-obese patients. The major finding of our study is that an acute *ex vivo* exposure to dietary lipids mimicking a meal is sufficient to unmask jejunal hyperpermeability to large molecules in severe obesity. Our results in Caco-2/TC7 cells indicate that lipids *per se* are able to increase paracellular permeability through direct effects on tight junctions, and especially tricellular tight junctions, which were recently identified as a pathway for macromolecules [34]. As we

previously demonstrated, complex lipid micelles used in the current study preserved cell viability and epithelial integrity [31]. Therefore, increased permeability to macromolecules cannot be attributed to cellular damage. Among lipid micelle components, some bile acids have been shown to alter intestinal barrier function [37,43]. However, in our conditions, taurocholic acid, the most abundant conjugated primary bile acid, alone or mixed with the other main bile components (cholesterol and L- α -lysophosphatidylcholine) did not change epithelial permeability. Altogether, our results suggest that tight junctions could be modified through the rapid activation of signaling pathways triggered specifically by micelles containing triglyceride hydrolysis products, as previously shown for dietary lipid sensing through the scavenger receptor SR-B1/CLA-1 [44]. Such acute effects of lipid micelles on permeability were replicated in human jejunal samples, with more prominent effects in obese patients, supporting the hypothesis that acute lipid consumption may impair intestinal barrier function with an impact on host response. By promoting the trans-epithelial passage of macromolecules, lipid-mediated alterations of tight junctions could exacerbate local immune responses with systemic consequences [30]. This is in accordance with our results showing a correlation between gut permeability upon lipid exposure and systemic inflammation assessed by CRP. Furthermore, fecal calprotectin, a surrogate marker of intestinal inflammation in IBD [45], was correlated with permeability after lipid challenge and thereby could constitute a reliable marker of postprandial-induced barrier alteration in obesity. Our results support the hypothesis that deleterious effects of acute lipid loads on intestinal barrier properties add up to those due to the chronic lipid consumption already described in several previous studies [12]. In obese patients, a weakened barrier during fasting would be more sensitive to nutrient/luminal challenges. To go further in this way, the links between daily food intake and gut permeability remain to be explored in detail. While lipids are a representative nutrient challenge, other molecules known to alter the intestinal barrier, including alcohol and non-steroidal anti-inflammatory drugs [2,46], would be of interest to test in future studies.

Another important result is the observation of an independent link between lipid-induced jejunal hyperpermeability and metabolic conditions of obese patients. Indeed, lipid-induced permeability was a significant explicative variable of type 2 diabetes, independent of age, sex, BMI or baseline jejunal permeability, whereas intestinal permeability measured at the fasting state, regardless of the method, was comparable between diabetic and non-diabetic obese patients. Various tissue and systemic alterations associated with diabetes may increase jejunal sensitivity to lipid-mediated barrier impairment. This includes pro-inflammatory cytokines, which have been shown to trigger intestinal barrier dysfunction through mechanisms initiated at the basal side of epithelial cells [3]. Importantly, we previously showed immune cell accumulation and local cytokine

expression in the jejunum of obese patients according to their metabolic status [10]. Recently, Thaiss *et al.* demonstrated a hyperglycemia-mediated barrier disruption through a mechanism initiated at the basal membrane [47]. Interestingly, hyperglycemia is associated with decreased bacterial–epithelial distance in the colon, which may contribute to barrier dysfunction [48]. Therefore, the integration of the different signals originating from both luminal and basolateral environments and the interaction between the microbiota and the mucus layer are important factors to investigate in future studies.

In order to establish a reliable clinical measure easily applicable to obese patients, we examined *in vivo* markers of intestinal barrier dysfunction. The urinary L/M ratio has been commonly used to investigate permeability in intestinal and extra-intestinal diseases [49]. Despite this, few studies have investigated *in vivo* permeability in obese patients and they have shown conflicting results [14–16,50]. Herein, we report no statistical difference in L/M ratios between non-obese patients and patients with severe obesity, and found no link with clinical and biological phenotypes. However, zonulin, a marker of intestinal tight junction impairment in celiac disease and type 1 diabetes [51], and LBP, an LPS transporter, were increased in obese patients, in accordance with previous observations in overweight or moderately obese patients [18,52–54]. Notably, none of these *in vivo* biomarkers of altered barrier function correlated with permeability measured in Ussing chambers. Collectively, these results show that a reliable tool measuring permeability for clinical practice remains to be identified in the context of human metabolic disease. The search for intestinal permeability and epithelial integrity biomarkers is also a major issue in other pathological conditions such as IBD. Moreover, the establishment of physiological values for permeability or other parameters reflecting healthy barrier function is a prerequisite for future prospective studies assessing the benefit of surgical or nutritional interventions [55].

In conclusion, the ‘leaky gut’ paradigm can be extended to human severe obesity, although the intestinal barrier dysfunction differs significantly from the rodent models. In human obesity, whereas only subtle barrier alterations are evidenced in the fasting state, increased jejunal permeability is unequivocally revealed by a lipid load and is associated with inflammatory and metabolic status. These results emphasize the need to consider if, and how, repeated lipid challenges can alter intestinal permeability and play a role in the pathophysiology of intestinal barrier function and downstream metabolic impairment in obesity. Further research on this topic would pave the way for new nutrition strategies in preventive medicine.

Acknowledgements

We would like to thank V Lemoine (clinical research assistant ICAN) for help in clinical investigation, Dr

F Marchelli (NutriOmic team) for data management, and ICAN CRB members for their contribution to bio-banking; Dr A Ayed for analyzing the percentage of visceral fat mass with tomography; Dr J Draï for zonulin measurement; C Buisson for LBP and sCD14 assays; CT Hauv and D Manene for technical help at the Department of Functional Coprology; S Benaissa and L Petit for technical assistance in Ussing chamber and cell culture experiments; K Garbin at the CICC platform (Cordeliers Research Center) for help in immunofluorescence and image analyses; Drs A Torcivia, J-M Siksik, A Saget, and N Helmy for support in surgical jejunum sample collection; M Moreau for support in WES analysis; Dr V Carrière for constant support, helpful discussions, and critical rereading; Dr M Le Gall for constructive rereading of the manuscript; Dr D Stockholm for advice on fluorescence quantification with FIJI; and Dr T Swartz for English editing. This work was supported by funds obtained from ICAN Institute for transversal leaky gut project, Benjamin Delessert Institute, Groupe Lipides et Nutrition (GLN), Appert Institute (UPPIA), Fondation Obélisque, Fondation Nestlé, Société Française et Francophone de Chirurgie de l'Obésité et des Maladies Métaboliques (SOFFCO-MM), Société Française de Chirurgie Digestive (SFCD), the EU-project Metacardis No HEALTH-F4-2012-305312, as well as institutional funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Pierre et Marie Curie, and the Ecole Pratique des Hautes Études. Clinical study was promoted by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. DA was the recipient of a fellowship from CORDIM Ile de France.

Author contributions statement

CP, ST, and AL designed the study. CP coordinated clinical investigation. JMO, CP, and KC contributed to obese subject recruitment, patient phenotyping, and sample collection. LG and JES contributed to non-obese subject recruitment and phenotyping. JCV, LG, and PW operated on the patients. LG, LD, ST, DA, MR, and EBL performed Ussing chamber experiments, tight junction analysis, and Caco-2/TC7 cell experiments. MCM and FL performed zonulin, sCD14, and LBP measurements. LT performed lactitol/mannitol tests. LG, HS, and KA performed statistical analyses. CP, ST, and LG analyzed data and wrote the manuscript. AL, KC, MR, and EBL contributed to data presentation and to writing the manuscript. All authors reviewed the manuscript. CP and ST are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; **11**: 1075–1083.

- Konig J, Wells J, Cani PD, et al. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin Transl Gastroenterol* 2016; **7**: e196.
- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 799–809.
- Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; **14**: 9–21.
- Dalmas E, Rouault C, Abdennour M, et al. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr* 2011; **94**: 450–458.
- Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr* 2011; **106**(suppl 3): S5–S78.
- Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012; **56**: 1751–1759.
- Dalmas E, Venticlef N, Caer C, et al. T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 β -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2014; **63**: 1966–1977.
- Grant RW, Dixit VD. Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity (Silver Spring)* 2015; **23**: 512–518.
- Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sa C, et al. Jejunal T cell inflammation in human obesity correlates with decreased enterocyte insulin signaling. *Cell Metab* 2015; **22**: 113–124.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; **57**: 1470–1481.
- Araujo JR, Tomas J, Brenner C, et al. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie* 2017; **141**: 97–106.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; **56**: 1761–1772.
- Teixeira TF, Souza NC, Chiarello PG, et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clin Nutr* 2012; **31**: 735–740.
- Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *Am J Clin Nutr* 2017; **105**: 127–135.
- Brignardello J, Morales P, Diaz E, et al. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; **32**: 1307–1314.
- Basu S, Haghiac M, Surace P, et al. Pregavid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obesity (Silver Spring)* 2011; **19**: 476–482.
- Vors C, Pineau G, Draï J, et al. Postprandial endotoxemia linked with chylomicrons and lipopolysaccharides handling in obese versus lean men: a lipid dose–effect trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; **100**: 3427–3435.
- Winer DA, Luck H, Tsai S, et al. The intestinal immune system in obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 2016; **23**: 413–426.
- Johnson AM, Costanzo A, Gareau MG, et al. High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PLoS One* 2015; **10**: e0122195.
- Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, et al. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; **308**: G840–G851.
- Tomas J, Mulet C, Saffarian A, et al. High-fat diet modifies the PPAR-gamma pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**: E5934–E5943.

23. Ghoshal S, Witt J, Zhong J, *et al.* Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res* 2009; **50**: 90–97.
24. Erridge C, Attina T, Spickett CM, *et al.* A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* 2007; **86**: 1286–1292.
25. Laugerette F, Vors C, Geloan A, *et al.* Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *J Nutr Biochem* 2011; **22**: 53–59.
26. Watson CJ, Hoare CJ, Garrod DR, *et al.* Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *J Cell Sci* 2005; **118**: 5221–5230.
27. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2015; **38**(suppl 1): S8–S16.
28. Ciangura C, Bouillot JL, Lloret-Linares C, *et al.* Dynamics of change in total and regional body composition after gastric bypass in obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 2010; **18**: 760–765.
29. Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, *et al.* Differential expression of sucrase–isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* 1994; **107**(Pt 1): 213–225.
30. Menard S, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol* 2010; **3**: 247–259.
31. Chateau D, Pauquai T, Delers F, *et al.* Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* 2005; **202**: 767–776.
32. Heller F, Florian P, Bojarski C, *et al.* Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; **129**: 550–564.
33. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, *et al.* Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; **56**: 61–72.
34. Krug SM, Amasheh S, Richter JF, *et al.* Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 3713–3724.
35. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, *et al.* Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; **300**: G1054–G1064.
36. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, *et al.* Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; **292**: G518–G525.
37. Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)* 2010; **7**: 19.
38. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, *et al.* Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation *in vivo*. *J Cell Biol* 2010; **189**: 111–126.
39. Kojima T, Fuchimoto J, Yamaguchi H, *et al.* c-Jun N-terminal kinase is largely involved in the regulation of tricellular tight junctions via tricellulin in human pancreatic duct epithelial cells. *J Cell Physiol* 2010; **225**: 720–733.
40. Bucker R, Schulz E, Gunzel D, *et al.* α -Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. *Gut* 2014; **63**: 1893–1901.
41. Clarke LL. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; **296**: G1151–G1166.
42. Murakami Y, Tanabe S, Suzuki T. High-fat diet-induced intestinal hyperpermeability is associated with increased bile acids in the large intestine of mice. *J Food Sci* 2016; **81**: H216–H222.
43. Sarathy J, Detloff SJ, Ao M, *et al.* The Yin and Yang of bile acid action on tight junctions in a model colonic epithelium. *Physiol Rep* 2017; **5**: e13294.
44. Beaslas O, Cueille C, Delers F, *et al.* Sensing of dietary lipids by enterocytes: a new role for SR-BI/CLA-1. *PLoS One* 2009; **4**: e4278.
45. Benitez JM, Garcia-Sanchez V. Faecal calprotectin: management in inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2015; **6**: 203–209.
46. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, *et al.* Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 2014; **14**: 189.
47. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, *et al.* Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science* 2018; **359**: 1376–1383.
48. Chassaing B, Raja SM, Lewis JD, *et al.* Colonic microbiota encroachment correlates with dysglycemia in humans. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017; **4**: 205–221.
49. Salles Teixeira TF, Boroni Moreira AP, Silva Souza NC, *et al.* Intestinal permeability measurements; general aspects and possible pitfalls. *Nutr Hosp* 2014; **29**: 269–281.
50. Savassi-Rocha AL, Diniz MT, Vilela EG, *et al.* Changes in intestinal permeability after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 2014; **24**: 184–190.
51. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev* 2011; **91**: 151–175.
52. Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ortega F, *et al.* Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PLoS One* 2012; **7**: e37160.
53. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serino M, *et al.* Circulating lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as a marker of obesity-related insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2012; **36**: 1442–1449.
54. Mokkala K, Pellonpera O, Roytio H, *et al.* Increased intestinal permeability, measured by serum zonulin, is associated with metabolic risk markers in overweight pregnant women. *Metabolism* 2017; **69**: 43–50.
55. Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, *et al.* Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; **312**: G171–G193.
- *56. Petit CS, Barreau F, Besnier L, *et al.* Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2012; **143**: 122–132.e15.

*Cited only in supplementary material.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

Supplementary figure and methods legends

Figure S1. Immunofluorescence analysis of occludin and tricellulin at tight junctions of human jejunum samples

Figure S2. WES analysis of occludin and tricellulin levels in human jejunum samples

Figure S3. Effect of different combinations of lipids on TEER and on permeability to FITC-Dextran 4 kDa

Table S1. Detailed P and n values corresponding to the generalized linear model including different intestinal permeability hallmarks and anti-diabetic treatments as categorical variables

Table S2. Detailed rho, P , and n values corresponding to analyses of partial correlation between different hallmarks of altered intestinal barrier function

Table S3. Analyses of partial correlation between obesity-related phenotype and hallmarks of altered intestinal barrier function

Intestinal plasticity in response to nutrition and gastrointestinal surgery

Maude Le Gall, Sophie Thenet, Doriane Aguanno, Anne-Charlotte Jarry, Laurent Genser, Lara Ribeiro-Parenti, Francisca Joly, Séverine Ledoux, André Bado, and Johanne Le Beyec

The plasticity of a material corresponds to its capacity to change its feature under the effect of an external action. Intestinal plasticity could be defined as the ability of the intestine to modify its size or thickness and intestinal cells to modulate their absorption and secretion functions in response to external or internal cues/signals. This review will focus on intestinal adaptation mechanisms in response to diet and nutritional status. These physiological mechanisms allow a fine and rapid adaptation of the gut to promote absorption of ingested food, but they can also lead to obesity in response to overnutrition. This plasticity could thus become a therapeutic target to treat not only undernutrition but also obesity. How the intestine adapts in response to 2 types of surgical remodeling of the digestive tract—extensive bowel resection leading to intestinal failure and surgical treatment of pathological obesity (ie, bariatric surgeries)—will also be reviewed.

INTRODUCTION

The gastrointestinal tract is the organ primarily responsible for food digestion and nutrient absorption. The intestinal epithelium acts as a barrier protecting the internal environment from luminal content while controlling the absorption of nutrients, water, electrolytes, and vitamins. The intestine is also the largest endocrine organ of the body by the amount and diversity of hormones or peptides it can secrete.¹ These hormones act directly on the gastrointestinal tract and the enteric nervous system or, after transfer to the lymph and blood,

on peripheral and central organs. They participate in the control of gastric emptying and intestinal motility; the control of food intake and intestinal nutrient absorption; and the regulation of glycemia, notably by modulating insulin secretion.

The integrity and homeostasis of the intestinal epithelium depends on the precise spatiotemporal coordination of proliferation, migration, differentiation, and cell-death processes.² The constant renewal of this epithelium is extremely rapid, with most intestinal cells renewed in 2–3 days in rodents and 5–7 days in human. Renewal allows for rapid adaptation of the intestine to

Affiliation: *M. Le Gall, A.-C. Jarry, L. Ribeiro-Parenti, F. Joly, S. Ledoux, A. Bado, and J. Le Beyec* are with the Centre de Recherche sur l'Inflammation, Inserm UMRS _1149, Université Paris Diderot, AP-HP, Paris, France. *S. Thenet and D. Aguanno* are with the Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, EPHE, PSL University, Sorbonne Cités, UPD Univ Paris 05, INSERM, CNRS, Paris, France. *L. Genser* is with the Sorbonne Université, INSERM, Nutriomics Team, Paris, France, and the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Department of Hepato-Biliary and Pancreatic Surgery, Liver Transplantation, Paris, France. *L. Ribeiro-Parenti* is with the Department of General and Digestive Surgery, University Hospital Bichat–Claude-Bernard, Paris, France. *F. Joly* is with the Department of Gastroenterology, Inflammatory Bowel Diseases, Nutritional Support and Intestinal Transplantation, Paris, France. *S. Ledoux* is with the Service des Explorations Fonctionnelles, Centre de référence de prise en charge de l'obésité, GHUPNVS, Hôpital Louis Mourier, Colombes, France. *J. Le Beyec* is with the Sorbonne Université, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Biochimie Endocrinienne et Oncologique, Paris, France.

Correspondence: *M. Le Gall*, Gastrointestinal and Metabolic Dysfunctions in Nutritional Pathologies, Centre de Recherche sur l'Inflammation Paris Montmartre, Inserm UMRS_1149, Université Paris Diderot Paris 7, Faculté de Médecine Site Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75890 Paris Cedex 18, France. E-mail: maude.le-gall@inserm.fr.

Key words: enterocyte, enteroendocrine cell, intestinal barrier, Roux-en-Y gastric bypass, short bowel syndrome, sleeve gastrectomy.

©The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of the International Life Sciences Institute. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

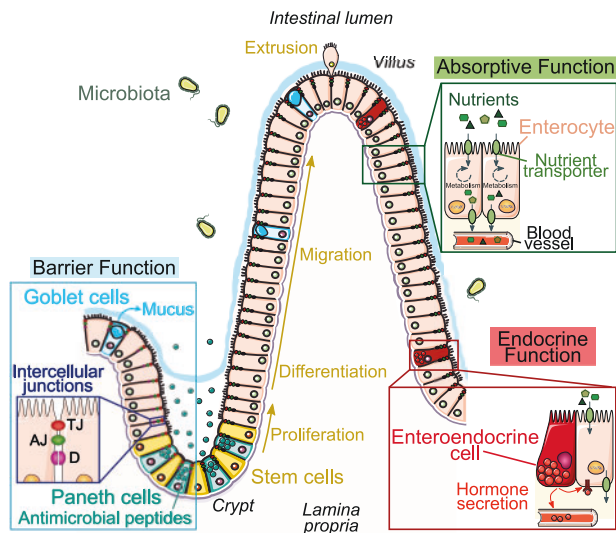


Figure 1 Schematic representation of the different cell types within the intestinal epithelium and their contribution to the 3 main functions of the small intestine. The small intestine presents a crypt-villus structure. Intestinal epithelial stem cells located in the crypts produce new proliferating cells that differentiate while migrating up the villus, except for Paneth cells residing at the base of the crypt. Eventually, differentiated cells are extruded into the intestinal lumen. Barrier function: Intestinal epithelial cells (IECs), through their intercellular junctions, form a biochemical and physical barrier that maintains segregation between intestinal lumen content and the interior milieu. Secretory goblet cells and Paneth cells secrete mucus and antimicrobial proteins, respectively, to promote the exclusion of microbiota from the epithelial surface. Absorptive function: Enterocytes correspond to 90% of the IEC, they are equipped with transporters that control nutrient passage from the lumen to the blood or lymph. Endocrine function: Enteroendocrine cells are pear-shaped cells scattered along the villus that secrete peptides into the blood. *Abbreviation:* IEC, intestinal epithelial cells.

its environment. The intestine modulates its size and absorption, barrier, or secretion capacities according to the nature and quantity of available nutrients but also according to the individual's physiological or pathological state. Adaptation may involve changes in intestinal cell number and absorptive and/or secreting functions, reflecting intestinal plasticity.

The intestinal epithelial cells are mainly enterocytes, goblet cells, Paneth cells, and enteroendocrine cells (Figure 1). All of those cells arise from the same intestinal stem cell residing at the base of the crypts but carry out different functions of the intestinal epithelium (ie, nutrient absorption, barrier, and endocrine functions). Numerous reviews have already reported the general mechanisms of epithelial cell differentiation.^{3–5} In addition, the contribution of the microbiota to intestinal functions has received a lot of attention.^{6,7} The present review focuses on intestinal adaptation mechanisms in relation to diet and nutritional status and in

response to 2 types of surgical remodeling of the gastrointestinal tract: extensive intestinal resection leading to short bowel syndrome (SBS) and surgical treatment of morbid obesity (ie, bariatric surgeries).

Intestinal adaptation can be divided into 2 categories: 1) a nonspecific adaptation corresponding to an increase in (or a reduction of) the total intestinal mass, causing a modulation of all nutrient absorption through increased surface exchange and endocrine secretions; 2) a more specific adaptation involving a particular function, provided by a cellular subtype whose number, location or nutrient transporter equipment are modulated by the nutritional or metabolic environment.

HYPERPLASIA AND HYPOPLASIA: NONSPECIFIC ADAPTATIONS OF THE INTESTINE

A simple and effective way to increase the intestinal absorption or secretion capacity is to increase the number of intestinal epithelial cells and thus to increase intestinal exchange surface (for recent review, see Dailey³)

A study in leptin-deficient (*ob/ob*) obese mice, in comparison with their heterozygote littermates (*ob/wt*), showed that obesity was associated with an increase in the intestinal absorption capacity of sugars and amino acids simply as a consequence of an increased intestinal mass.⁸ Dietary restriction in leptin receptor knockout mice (*db/db*) reverses the phenotype, suggesting that overeating and not an obese metabolic state per se is responsible for the increase in intestinal surface area and absorption of sugars.⁹ Accordingly, in streptozotocin-induced diabetic mice, hyperphagia may be responsible for the nonspecific increase in nutrient absorption because of the higher intestinal mass of these mice, whereas body weight was similar to that of the nondiabetic littermates.¹⁰ In humans, a recent study reported that hyperglycemic obese individuals display an increased enterocyte mass.¹¹ Even though nutritional effect (overeating, specific diet) cannot be distinguished from metabolic effect (insulin resistance and leptin resistance) in human studies, results from some studies suggest that hyperplasia may be related to food-related obesity rather than obesity-associated diabetes.¹²

Conversely, exclusion of nutrients from the intestinal lumen, as during exclusive parenteral nutrition, induces an atrophy of the intestinal epithelium.^{13–15} In a rat model under total parenteral nutrition, hypoplasia was reported as early as 3 days after the beginning of the parenteral nutrition.¹³ This hypoplasia was associated with a reduction in galactose intestinal absorption capacity.¹³ The presence of glutamate in the drinking water of mice under total parenteral nutrition seems to preserve the epithelium, suggesting that luminal signals contribute to the balance among proliferation,

differentiation, and apoptosis.¹⁶ More recently, exogenous glucagon-like peptide 2 (GLP-2) supplementation in the blood of mice under total parenteral nutrition was shown to partially prevent parenteral nutrition-associated intestinal mucus atrophy,¹⁷ suggesting that plasma signals could also contribute to the effect. These examples illustrate how the intestine responds directly to luminal and blood signals to adapt its mass and consequently its absorptive capacity.

PLASTICITY OF INTESTINAL ABSORPTIVE FUNCTION

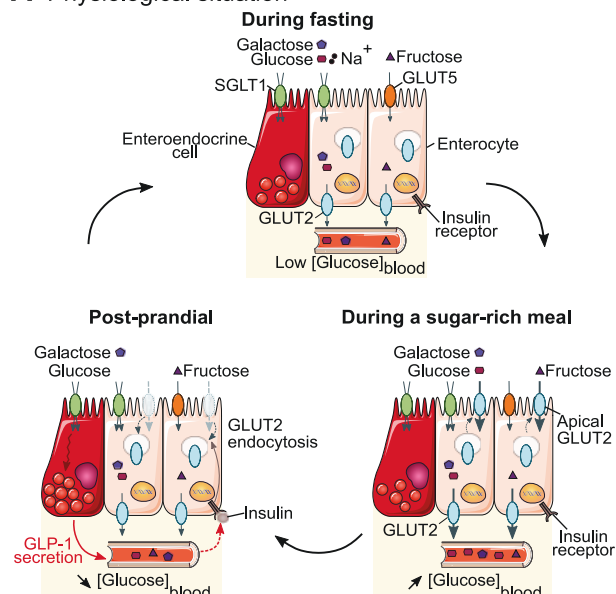
Intestinal absorptive cells, also known as enterocytes, represent 80%–90% of the epithelial cells of the small intestine. They ensure the absorption of macro- and micronutrients via a regulated transcellular pathway. These polarized cells exhibit microvilli at their apical pole, in which the enzymes (proteases and sucrases) of the final digestion of food, as well as transporters for nutrients, vitamins, electrolytes, and water, are inserted. The absorptive capacity of the intestine relies on the absorptive equipment of enterocytes, which can be modified during a single meal, depending on the nature of the ingested food, as well as during a specific diet.

Sugar absorption

The most illustrated example of enterocyte plasticity is probably the absorption of sugars during a meal.¹⁸ Dietary monosaccharides absorption occurs at the apical pole of enterocytes through the sodium-glucose/galactose co-transporter SGLT1 and the fructose transporter GLUT5 (Figure 2A). They exit the enterocytes to enter the bloodstream through the glucose, galactose, and fructose transporter GLUT2. However, during a sugar-rich meal, when sugar concentrations in the intestinal lumen exceed the transport capacities of SGLT1 (glucose) or GLUT5 (fructose), GLUT2 is rapidly transferred from intracellular storage vesicles to the apical pole of enterocytes, tripling the sugar-transport capacity of the intestine.¹⁹ After the meal, insulin induces GLUT2 delocalization from the apical membrane, reducing the entry of sugars into the blood.²⁰ Accordingly, it was recently reported that genetic ablation of the insulin receptor in intestinal epithelial cells reduces intestinal glucose uptake.²¹ This example, although still under discussion,^{22–24} illustrates the plasticity of the enterocyte in the short term because it takes place during a simple sugar-rich meal.

Long-term sugar-rich diets also modulate the expression levels of brush border transporters and sucrases (sucrase isomaltase, lactase, etc.).²⁵ The regulation of GLUT5 by fructose is characteristic. During postnatal development, rat pups progressively switch

A Physiological situation



B Pathological situation

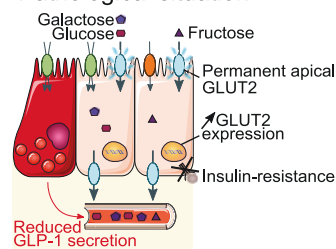


Figure 2 Intestinal adaptation in response to a meal or a diet exemplified by apical GLUT2 translocation. **A.** During fasting, when sugar concentrations are low in the intestinal lumen, glucose and galactose uptakes are ensured by sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1), and fructose uptake is ensured by GLUT5. Release of glucose, galactose, and fructose into the blood are ensured by GLUT2. During a sugar-rich meal, a pool of GLUT2 translocates from intracellular vesicles to the apical membrane. This translocation increases intestinal sugar uptake capacity. After the meal ingestion (postprandial), increased insulin secretion induces GLUT2 internalization from the apical membrane and reduces sugar uptake. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is secreted by enteroendocrine cells in response to a sugar meal. SGLT1 and maybe GLUT2 are sugar receptors triggering this secretion. **B.** In pathological conditions such as diet-induced obesity, insulin resistance results in a permanent apical GLUT2 location within the intestine. Obesity-associated insulin and leptin resistances are also associated with reduction of GLP-1 secretion by enteroendocrine cells. *Abbreviations:* GLP-1, glucagon-like peptide-1; SGLT1, Sodium-dependent glucose transporter 1.

from a low-sugar, high-fat diet (breast milk) to a high-sugar, low-fat diet (chow pellets). GLUT5 expression follows this evolution, increasing with the enrichment of fructose within the diet. Moreover, in newborn rats, GLUT5 expression levels, which are normally very low, can directly be induced by an early addition of fructose in complement to breast milk.²⁶

In addition to the diet, metabolic state modulates the intestine ability to transport sugars. As described previously, during a meal, insulin can modulate the location of GLUT2¹⁹; in addition, GLUT2 expression is increased in diabetic insulinopenic rats.²⁷ In insulin-resistant mice or obese humans, GLUT2 remains permanently localized at the brush border (Figure 2B) and may contribute to reported postprandial hyperglycemia.^{20,28} Insulin resistance-associated GLUT2 location can be induced by either a high-fat diet or a high-fructose diet, suggesting a preponderant role of the diet-induced metabolic state over the nature of the ingested nutrients in this process. Leptin can also modulate intestinal transport of sugars. Leptin was reported to decrease apical expression of SGLT1,^{29,30} reducing the active compound of glucose transport. On the other hand, leptin increases the activity of GLUT5,³¹ and mice specifically invalidated in intestine epithelial cells (IECs) for the leptin receptor (IEC KO LepR mice) exhibit a decreased fructose transport capacity.³² Finally, hormones secreted by enteroendocrine cells, such as glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and GLP-2, also modulate the apical activity of SGLT1 in the small intestine.^{33,34}

Protein absorption

Protein absorption is carried out after proteins are hydrolyzed, mainly into di- and tripeptides but also into amino acids. Most of the peptides are transported by the electrogenic proton-dependent transporter PEPT1,³⁵ whereas amino acids are transported by a large number of different systems.³⁶ Diet enrichment in proteins and/or amino acids modulates PEPT1 activity (for a review, see Spanier³⁵). In rats, a diet containing > 20% casein induces an increase in the expression and apical location of PEPT1.³⁷ Paradoxically, during a short fast, the expression of PEPT1 also increases,³⁸ suggesting that the intestine could equip itself to be prepared for the future arrival of nutrients. Leptin modifies the absorption of proteins by upregulating the expression and apical location of PEPT1,³⁹ and leptin knocked-out ob/ob mice⁴⁰ or IEC KO LepR mice³² display reduced PEPT1 activity. In agreement with these observations, in diet-induced obese mice with leptin resistance and an associated decrease in the expression of intestinal leptin receptors, the expression of PEPT1 (mRNA and protein) is weakened.⁴¹ Finally, in the human enterocytic cell line Caco-2, insulin regulates the apical location of PEPT1 without modulating its expression.⁴²

This set of experiments illustrates how peptide-transport capacity of the intestine can be modulated by PEPT1 expression and location in response to both nutrients and metabolic signals.

Lipid absorption

Unlike other nutrients, dietary lipids (ie, triacylglycerols mainly composed of long-chain fatty acids) are poorly water soluble and potentially toxic. Through the concomitant action of gastric and pancreatic lipases and bile acids, triglycerides are hydrolyzed into fatty acids and monoglycerides. Combined with cholesterol, bile acids, and phospholipids, they form lipid micelles within the intestinal lumen. Once absorbed by enterocytes, fatty acids and monoglycerides are bound to soluble lipid-binding proteins and, after re-esterification, secreted into lymph as triacylglycerol-rich lipoproteins also called chylomicrons. The absorption of lipids by enterocytes is therefore complex and involves many proteins in the various steps of absorption, intracellular trafficking, synthesis, and secretion of chylomicrons.⁴³ The expression and activity of these proteins are regulated by the luminal content, so the intestinal capacities of lipid absorption adapt to the lipid content of the diet, as illustrated in mice subjected to a high-fat diet.⁴⁴ In the Caco-2 cell line, the composition of the luminal micelles modulates expression of 46 genes from 3 major cell function categories (signal transduction, lipid metabolism, and cell adhesion/architecture),⁴⁵ suggesting that micelles are directly detected by receptors at the apical side of enterocytes, such as CD36 and SR-B1,⁴⁶ and can induce cell response. Insulin modulates the expression and/or activity of microsomal triglyceride transfer protein (MTP), a protein that plays a crucial role in the process of absorption of dietary lipids and their transfer to the circulation.⁴⁷ Thus, the composition of the diet in regards to fatty acids can also indirectly influence the metabolic regulation of these different steps by inducing intestinal insulin resistance.⁴⁷ The intestinal capacities of lipid absorption are also modulated by GLP-2 and GLP-1, whose secretions are predominantly stimulated by a high-fat diet or a fat-rich meal.⁴⁸ However, whereas GLP-1 decreases the production of ApoB-48, a chylomicron apolipoprotein, GLP-2 stimulates its production and thus the absorption of lipids, in particular by increasing the expression of the CD36 receptor.⁴⁸

Altogether, these studies indicate that changes in diet as well as metabolic state lead to adjustment of absorptive capacity of the intestine at the cellular and molecular levels to maximize nutrient absorption. As detailed below, these physiological adaptations may also lead to a pathological state, as illustrated in obesity.

PLASTICITY OF INTESTINAL ENDOCRINE FUNCTION

Enteroendocrine cells represent < 1% of all intestinal epithelial cells (Figure 1). They are scattered throughout

the gastrointestinal tract and are characterized by their location and by the nature of the hormones or peptides they secrete. Enteroendocrine cells present a peculiar pear-shaped morphology, opened toward the internal milieu. At the apical pole they present microvilli where receptors are able to detect intestinal luminal content and to induce an adapted response by the production of one or several hormones and their secretion at the basolateral pole⁴⁹ (Figure 2A). More than 20 peptides are secreted along the small intestine, including GIP secreted by K cells; cholecystokinin (CCK) secreted by I cells; and GLP-1, GLP-2, and peptide YY (PYY) secreted by L cells. K cells are located primarily in the duodenum, I cells in the duodenum and jejunum, and L cells in the jejunum, ileum, and colon, with distribution subtleties according to species.⁵⁰ The traditional view that enteroendocrine cells are specified by their location and their panel of secreted hormones has been revisited by the development of transgenic mice expressing fluorescent proteins under the control of enterohormone promoters (ie, proglucagon, GIP, or CCK).⁵¹ Transcriptomic analyses of these cells revealed that the same cell type is able to adapt to its environment by modulating its panel of produced and secreted hormones.⁵¹ Actually, the nature and number of hormones expressed and secreted depends not only on the proximal-distal location of enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract but also on local luminal stimuli, such as nutrients, microbiota, and biliopancreatic secretions, as well as systemic stimuli arising from the metabolic status of the individual.^{52,53}

Several studies have characterized endocrine cell density within the gastrointestinal tract in response to diet-induced obesity. A high-fat, low-sugar diet is associated with an increase in the density of cells expressing GLP-1 in the jejunum and colon of obese patients^{54,55} and rodents^{54,56} compared with lean individuals. This increase seems to be independent of the metabolic state because ob/ob obese mice under normal chow diet did not display any change in the number of GLP-1-positive cells.⁵⁴ Although it was reported that the density of cells expressing GIP increased in ob/ob mice under a high-fat or high-sugar diet,⁵⁷ this result was not reproduced in a transgenic mouse model with a GIP reporter transgene.⁵⁸ On the contrary, after 2 weeks the number of GIP-expressing cells decreased in mice fed a high-fat diet compared with mice fed chow.⁵⁵ However, a study also reported that, independently of the obesity state or the diet composition, the number of enteroendocrine cells is also modified during diabetes.⁵⁹ Surprisingly, in a piglet model of parenteral nutrition (ie, in absence of nutrients in the intestinal lumen), the number of enteroendocrine cells (chromogranin-A-positive cells) did not appear to be modified.¹⁴

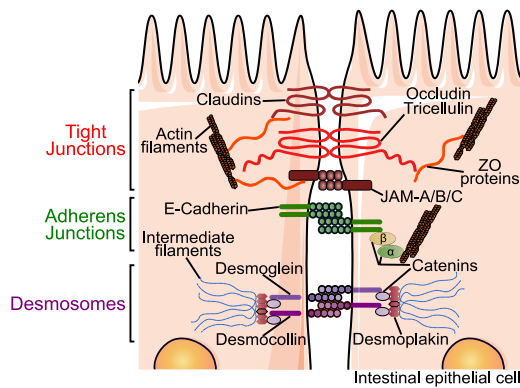
Of note, a change in the number or density of a specific enteroendocrine cell type is not necessarily associated with a change in plasma concentrations of the corresponding produced hormones. Under a sugar-rich diet, ob/ob mice display an increase in the number of jejunal cells expressing GIP without associated increased plasma levels of GIP, whereas under a high-fat diet, the same mice display an increase in both the number of GIP positive cells and the plasma levels of GIP.⁵⁷ More recently, an interesting study identified 2 types of mice responding to a high-fat diet⁶⁰: those maintaining normal blood glucose levels and those developing hyperglycemia and insulin resistance with the same weight gain. The former had an L-cell density and number comparable with mice under control diet but an increase in GLP-1 secretion during a glucose tolerance test. On the contrary, the latter mice displayed an increase in the number of GLP-1-producing cells but secreted less GLP-1 during the glucose tolerance test (Figure 2B). The increase in L-cell numbers probably constitutes an attempt to compensate for the functional failure of the cells.^{54,60} These differences raise the question of the signals influencing enteroendocrine cell function and their plasticity, beyond the diet and nutrients, such as glucose or fatty acids, that are known to stimulate hormone production.^{24,49} Specific microbiota may be at play. Indeed, some probiotics that induce changes in the composition of the microbiota in obese mice are associated with a higher density of L cells as well as a higher expression of proglucagon in these cells.⁶¹ The fermentation of this type of probiotic by the microbiota produces short-chain fatty acids that increase stem-cell differentiation into L cells in intestinal organoids.⁶²

PLASTICITY OF THE INTESTINAL BARRIER FUNCTION

All intestinal epithelial cells are connected by intercellular junctions and form a physical barrier preventing the passage of toxins, dietary antigens, microbial products, and microorganisms from the intestinal lumen into the body (Figure 1 and Figure 2). Scattered within the majority of absorptive enterocytes, secretory goblet and Paneth cells are specialized cells contributing to the barrier function of the epithelium and to innate immune defense by producing and secreting mucins and antimicrobial peptides, respectively. The mucus layer and the antimicrobial peptides limit the number of luminal bacteria and bacterial components coming in close contact with the epithelial cell monolayer.⁶³

The regulation of paracellular permeability (ie, the transfer of solutes through the intercellular space) is ensured primarily by tight junctions (TJs) (Figure 3A). These multiprotein complexes are formed by

A Intercellular junctions' structure



B Intestinal barrier impairment in a pathological context

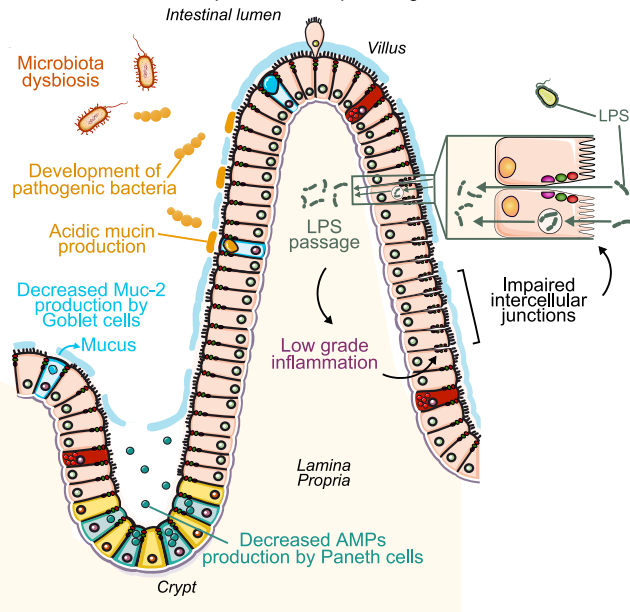


Figure 3 The intestinal barrier in physiology and in pathology. **A.** Simplified scheme of the three junctions involved in cell–cell adhesion in intestinal epithelial cells: tight junctions, adherens junctions, and desmosomes, which together form the apical junctional complex. Tight junctions control the paracellular permeability: different claudins ensure a selective permeability to cations and anions, whereas occludin (at bicellular tight junctions) and tricellulin (at tricellular tight junctions) control the permeability to macromolecules. These transmembrane proteins are connected to the actin cytoskeleton through several adaptor proteins such as ZO proteins. In adherens junctions, E-cadherin is connected to actin by the catenin complex, whereas the molecular complex forming desmosomes is connected to intermediate filaments of keratins. **B.** Intestinal barrier impairment in pathological situations can be due to tight junction defects. These defects lead to excessive passage of luminal components such as lipopolysaccharides, contributing to tissue and systemic inflammation. Lipopolysaccharides can also cross the epithelial layer by a transcellular pathway (inset). Other intestinal barrier defects have been described, such as modification of the quantity and quality of the mucus layer, decreased secretion of antimicrobial peptides, both causing modifications of the microbiota composition. Conversely, an altered microbiota can impact all of the barrier actors. *Abbreviations:* AMPs, antimicrobial peptides; LPS, lipopolysaccharides.

transmembrane proteins (eg, JAM-A, claudins, occludin, tricellulin), which are connected to the actin cytoskeleton through several adaptor molecules (eg, ZO-1, -2, and -3) and different signaling proteins. Two paracellular routes through the TJs have been described. In physiological conditions, the main one is the pore pathway, a large-capacity but highly charge- and size-selective route.⁶⁴ It is generated by the pores formed by the claudins and allows the passage of ions and small solutes (up to 6–10 Å in diameter).⁶⁴ A distinct pathway, called the leak pathway, is less selective, allowing the passage of larger molecules (up to 10 nm in diameter) but is supposed to have a very limited capacity in physiological conditions.⁶⁴ An altered intestinal barrier function can thus result from a combination of events affecting the properties of TJs (ie, both paracellular pathways), as well as the transcellular transports, the mucus layer, and/or the adaptive and innate immune cell compartment (Figure 3B). How plasticity of intestinal epithelial cells in response to food abundance or scarcity also impacts the epithelial barrier function will be discussed.

Increased intestinal permeability in response to a high-fat diet has been documented in multiple studies and recently reviewed.⁶⁵ In particular, paracellular permeability to large tracers such as dextran 4kDa was shown to be increased.^{66–69} Levels of occludin and its intracellular partner ZO-1 were decreased at the mRNA and/or protein levels,^{66,70} and their subcellular location was impaired.^{71,72} In addition, a decreased trans-epithelial resistance, which reflects altered ion permeability, has also been described in mice fed a high-fat diet and was accompanied by a switch in the expression of claudin, in particular increased expression of claudin-2.⁷³ It is currently proposed that excessive passage of macromolecules could contribute to local activation of immune cells, thereby contributing to tissue and systemic low-grade inflammation. Accordingly, inflammation hallmarks such as tumor necrosis factor α , interleukin 1 β , and interleukin 6 expression, activation of the NF κ B pathway, and myeloperoxidase activity have been evidenced in the short bowel or the colon of mice fed a high-fat diet.^{70,74} Nevertheless, other studies failed to demonstrate any sign of intestinal inflammation.⁶⁷

The so-called Western-style diet is a high-fat and high-sugar diet. Beside lipids, the possible contribution of excessive sugar consumption to dysfunction of the intestinal barrier has been also examined. The existence of an increased paracellular pathway for sugars due to the opening of TJs in response to the activation of the sodium-glucose cotransporter SGLT1 has been proposed.⁷⁵ How excessive glucose consumption in long-term diet affects the intestinal barrier still needs to be investigated. In mice, chronic consumption of 30% fructose in drinking water led to a decreased expression of occludin and ZO-1 protein.^{76,77} Notably, fructose consumption was associated with increased intestinal permeability only in combination with a Western-style diet.⁷⁷

Impaired mucus barrier is another feature of intestinal barrier alteration. The capacity of goblet cells to produce and secrete Mucin 2 (Muc-2), the main component of the intestinal mucus,⁶⁷ was decreased in diet-induced obese mice^{78,79} after 4 weeks (ie, before the onset of obesity and metabolic alterations)⁸⁰ (Figure 3B).

Increased endotoxemia (ie, presence of bacterial lipopolysaccharides [LPS] in the circulation) has been observed in parallel of the increased intestinal permeability induced by a high-fat diet^{66,81} and Western-style/high-fructose diet.⁷⁷ This metabolic endotoxemia is an important contributor to low-grade inflammation and metabolic dysregulations because slow LPS infusion can recapitulate part of the alterations induced by the high-fat diet⁸² (Figure 3B). Endotoxemia induced by a high-fat diet is often proposed to be a consequence of the increased intestinal permeability. This hypothesis is reasonable because LPS has been shown to cross the epithelial monolayer via the paracellular pathway.⁸³ However, LPS is also transported from the gut lumen via a transcellular pathway (reviewed in Guerville and Boudry⁸⁴; Figure 3B inset) and can be secreted via chylomicrons after an acute lipid supply.^{85–87} Therefore, increased endotoxemia upon lipid consumption does not necessarily reflect increased paracellular permeability, and LPS measurement to assay intestinal permeability needs to be clarified. Lipopolysaccharides are probably not the only bacterial components found within the organism. The detection of bacterial DNA in the circulation, as well as whole commensal bacteria in mesenteric adipose tissue and lymph nodes, has been described in mice fed a high-fat diet.⁸⁸ Whole bacteria may cross the epithelial lining, but it remained to determine through which pathway and whether it could be related to any nutritional condition.^{88,89}

The dysbiosis induced by a high-fat diet in mice (and its parallel in human obesity) is beyond the focus of this paper and has been documented in recent reviews.^{65,90} Links between dysbiosis and increased

intestinal permeability in mice fed a high-fat diet still need to be investigated in depth. Antibiotics alleviated intestinal hyperpermeability induced by a 4-week high-fat diet,⁶⁶ suggesting that the composition of the microbiota participates in the remodeling of the intestinal barrier. However, because modifications of the microbiota composition are observed in parallel to barrier alterations in response to diet, direct effects of dietary components versus microbiota modifications are difficult to decipher.⁹¹ Of note, increased intestinal permeability has potentially very different consequences depending on which segment is affected: the small intestine, where most nutrients are absorbed, and/or the colon, in which the mucus layer is thicker and the microbiota concentration much higher.^{68,92,93}

Although the impact of high-fat diet on intestinal permeability has been largely illustrated, the contribution of obesity per se is more controversial because ob/ob mice under a normal chow diet were reported to either present an increased permeability^{66,67,94} or not.^{69,95} A study conducted in parallel in a lean and an obese rat strain, both submitted to a high-fat diet for 16 weeks, indicated that dietary fat but not genetic obesity was involved in the increase of small intestine permeability.⁹² In few studies, barrier alterations were described before weight gain and metabolic alterations.^{67,80} In 1 study that aimed to compare the impact of genetic background, quality, and quantity of lipids and duration of the diet, impaired metabolic state was not accompanied by any alteration of the intestinal barrier function.⁹⁶ These data suggest that intestinal defects could occur early in the cascade of events leading to obesity in response to inappropriate diet and that luminal signals more than the metabolic state are involved. However leptin administration or graft of visceral adipose tissue in lean rats was shown to increase intestinal permeability; this effect could be due to a disorganization of TJs through a RhoA-ROCK-dependent pathway, which was evidenced in the human intestinal epithelial cells Caco-2.⁹⁷ Authors of a recent study conducted in various mouse models of obesity and diabetes propose that hyperglycemia, rather than obesity or alteration of leptin signaling, drives increase of intestinal permeability through modifications of TJ gene expression in epithelial cells via a GLUT2-dependent mechanism.⁹⁸

Fewer studies have documented alterations of gut barrier in food restriction or deprivation.⁹⁹ The mechanisms may differ at least in part from those involved upon overfeeding because, in response to food deprivation, epithelial homeostasis seems to be disturbed with decreased villous height and crypt depth.¹⁰⁰ Total parenteral nutrition has been associated with increased intestinal permeability¹⁰¹ leading to an increase in bacterial translocation.¹⁰² Modification of TJs or mucus

composition have been involved.^{14,101} Animals under parenteral nutrition also present a decrease in the production of antimicrobial peptides by Paneth cells,¹⁰³ leading to reduced intestinal bactericidal capacities.¹⁰⁴ Thus a major consequence of total parenteral nutrition is not only the development of mucosal atrophy but also a loss of epithelial barrier function, which may lead to an increase in clinical infections and septicemia. The fact that both food abundance and scarcity lead to a similar increase in gut permeability with shared mechanisms (ie, reduced TJ protein expression, changes in mucus composition, and dysfunctional Paneth cells) raises the question of how the lumen content influence these parameters.

In humans, noninvasive methods are most often performed to investigate intestinal permeability in response to obesity or metabolic diseases. These indirect methods, based on endotoxemia evaluation or lactitol-manitol urinary excretion, gave rise to discordant results.^{105–109} Interestingly, caloric restriction in obese individuals induced decreased intestinal permeability, which was not linked with weight loss, raising the question of the contribution of nutrient intake versus that of the metabolic state in human gut barrier alterations.¹¹⁰ In a recent study, TJ modifications were evidenced in the jejunum of severely obese patients.¹¹¹ Although only a subtle increase of permeability was measured in the jejunum taken at the fasting state, a single ex vivo exposure to dietary lipids mimicking a meal was sufficient to unmask jejunal hyperpermeability in obese patients.¹¹¹ These results suggest that the intestinal barrier is weakened in obese individuals and is more sensitive to nutrient/luminal challenges. Moreover, jejunal permeability after the lipid challenge was correlated with systemic and intestinal inflammation, as well as with type 2 diabetes, confirming in humans the links between intestinal permeability and metabolic alterations previously demonstrated in rodents.

Beyond unquestionable correlations, a causative role of an impaired intestinal barrier in inflammation and other obesity-associated metabolic alterations remains to be demonstrated in humans. In mice, the knockout of the gene *Fllr* encoding the TJ protein JAM-A has recently been shown to exacerbate steatohepatitis induced by a high-fat diet.¹¹² These data highlight that the intestinal barrier is not only a target but also an important actor in metabolic diseases and that improving its function could potentially constitute a therapeutic strategy to prevent obesity and/or its metabolic complications. Future studies will address the different possible mechanisms leading to intestinal barrier defects and how signals originating from both luminal and basolateral environments are integrated to finely tune intestinal permeability.

INTESTINAL PLASTICITY IN RESPONSE TO SURGERY

Changes in the nutritional and metabolic environment modify the number and function of intestinal epithelial cells (enterocytes, endocrine, goblet, and Paneth cells), illustrating the plasticity of the intestinal epithelium. However, the gastrointestinal tract (Figure 4A) can be deeply remodeled by surgical procedures, such as extensive intestinal resections leading to SBS (Figure 4B) or surgical treatment of morbid obesity (Figure 4C). Although intestinal adaptation has been studied for a very long time after resection, the study of intestinal adaptation and its contribution to the beneficial effects of bariatric surgeries is much more recent.

Extensive resections of the intestine and short bowel syndrome

Short bowel syndrome is a rare disease with a prevalence of 7–10 patients per year per million persons. It results from an extensive resection of the intestine or congenital anomalies of the small intestine, with a remaining small bowel in continuity of < 200 cm. Mesenteric ischemia is one of the main causes of SBS in adults, but other etiologies, such as Crohn's disease, radiation enteritis, surgical complications, volvulus, and necrotizing enterocolitis, may also be a cause for the resection.¹¹³ Three categories of SBS are identified depending on the anatomy of the remnant intestine (Figure 4B): end-jejunosomy with no colon in continuity, jejuno-colic anastomosis with no ileo-cecal valve and a part of the colon in continuity, and jejuno-ileal anastomosis with both the ileo-cecal valve and the entire colon in continuity. Various consequences are observed according to the extent and site of the resection, as well as the health of the remaining intestine.¹¹⁴ The resulting reduced absorptive surface, accelerated transit time, and modification of the luminal environment (acid hypersecretion, bile acid modifications) can lead to malabsorption and result in intestinal failure, for which the reference treatment in Europe is parenteral nutrition. Associated conditions such as bacterial overgrowth and mucosal disease further compromise intestinal functions. Long-term parenteral nutrition is associated with substantial side effects, including catheter-related infections, venous thrombosis and loss of venous access, progressive steatohepatitis and further liver failure, and metabolic bone disease.^{114,115}

It has been known for a long time that extensive intestinal resection in rats results in hypertrophy of the remaining intestine.¹¹⁶ This hypertrophy results from hyperplasia with a higher proliferation rate in the crypts, inducing an increase in villi height and crypts depth in animal models,^{117,118} as well as in

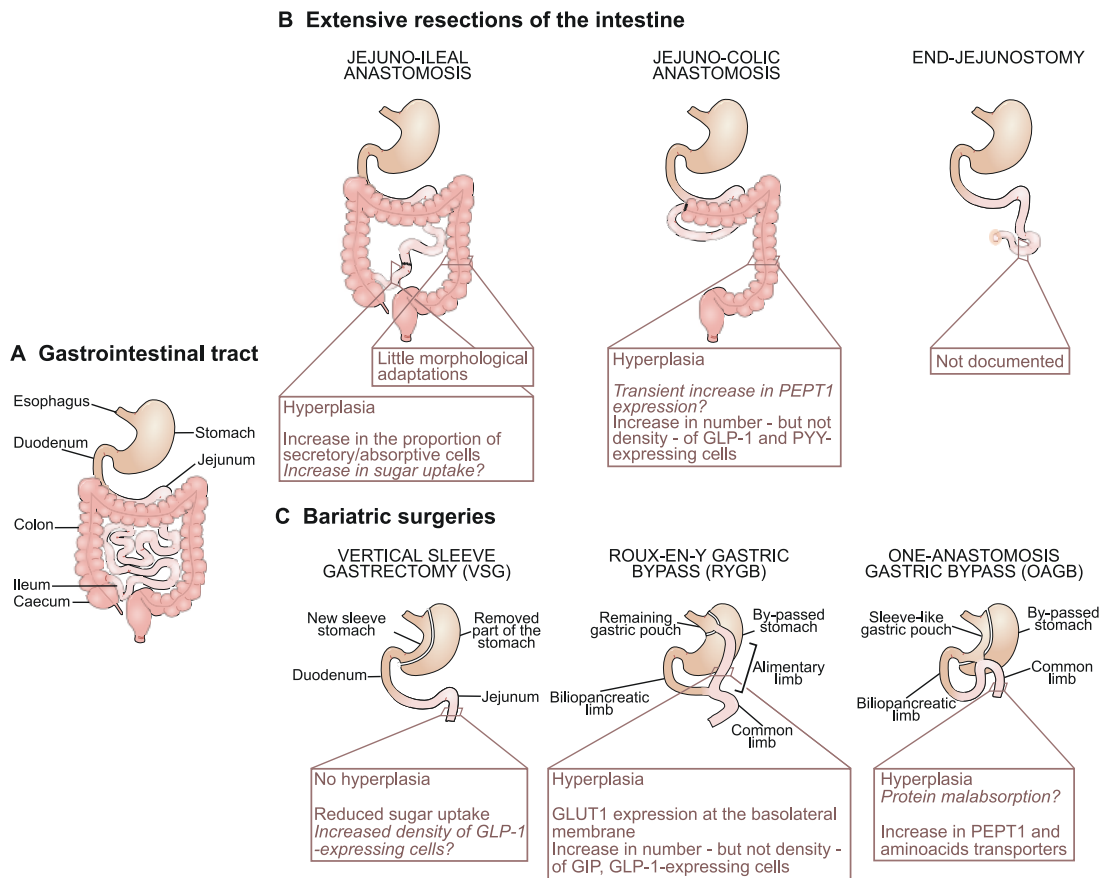


Figure 4 Gastrointestinal tract anatomy in physiology and after remodeling by surgery. A. Normal gastrointestinal tract anatomy. **B.** Gastrointestinal tract anatomy after massive resection of the intestine leading to short bowel syndrome (SBS). Three categories are recognized: end-jejunostomy with no colon and ileum (adaptation has not been reported); jejunocolic anastomosis with no ileum and no ileocecal valve (morphological and functional adaptations have been reported in the colon); and jejunoleileal anastomosis preserving colon, ileocecal valve, and distal part of the ileum (morphological and functional adaptations have been reported in the jejunum and/or ileum). **C.** Gastrointestinal tract anatomy after vertical sleeve gastrectomy (VSG), Roux-en-Y gastric bypass (RYGB), or one-anastomosis gastric bypass (OAGB) and the principal intestinal adaptation reported in the literature (see text for details).

humans.^{119,120} This morphological adaptation is strongly favored by the persistence of oral or enteral nutrition either in association or not with the parenteral nutrition.^{117,118,121,122} Adaptation may be observed all along the intestine (jejunum, ileum, colon), but it seems to depend on the length of resected intestine^{119,122} and the type of anastomosis.¹²² In resected rats with jejunoleileal anastomosis, there is little or no colonic morphological adaptation, contrary to what is observed in resected rats with a jejunocolic anastomosis.^{119,122} The nature of nutrients that pass through the different intestinal segments differs depending on the type of anastomosis, most likely resulting in specific localized adaptation. Nevertheless, some authors reported colonic adaptation in rats with ileocaecal resection under exclusive parenteral nutrition,^{123,124} suggesting that adaptation may be independent of the luminal presence of nutrients. In fact, in this study, despite the absence of nutrients, bilio-pancreatic secretions were still present

in the lumen of the intestine, and the colon was perhaps still exposed to unusual jejunal or ileal luminal content.¹²⁴ It has also been recognized that this adaptation is facilitated by circulating factors such as GLP-2 (whose secretion can be stimulated by nutrients or luminal content), as illustrated by parabiosis experiments between resected and nonresected animals (for a review, see O'Brien et al¹²⁵).

Only a few studies have investigated whether the proportion of the different intestinal epithelial cell types was altered after small bowel resection. In mice, resection with jejunoleileal anastomosis induced hyperplasia in the ileum associated with an increase in the proportion of secretory cells relative to absorptive cells.¹²⁶ However, this increase in the density of secretory cells has not been confirmed for enteroendocrine cells in the colon of an SBS rat model.¹²²

In addition to these morphological changes, functional adaptations have also been observed during the

SBS pathology. In SBS animal models, increases in transporters and exchangers involved in absorption of nutrients, electrolytes, and water have been reported. For example, an increase in the uptake of sugars has been observed,¹²⁷ but it remains controversial.¹²⁸ In fact, these increases may be linked to a nonspecific intestinal adaptation resulting in an increase in total exchange surface rather than a net increase in the activity or expression level of specific sugar transporters.¹²⁷ However, some authors also reported an increase in SGLT-1 mRNA expression in the jejunum and ileum of rats resected with jejuno-ileal anastomosis,¹²⁹ and addition of hepatocyte growth factor by infusion stimulated the expression of SGLT1 and GLUT5.¹³⁰ An increase in the expression of PEPT1 has been demonstrated in the colonic mucosa, but not in the jejunum, of patients with a jejuno-colic anastomosis operated on < 2 years before.¹³¹ However, another study conducted in patients > 9 years after their resection did not recapitulate this increase,¹²⁰ suggesting that the colonic elevation of PEPT1 could be an early adaptive event. Finally, an increase in the sodium/hydrogen exchangers NHE2 and NHE3,¹³² as well as aquaporins,¹³³ all of which are involved in hydroelectric exchanges, has been reported in ileal or colonic mucosa of murine models of SBS.

A functional adaptation has also been observed for the production and secretion of enterohormones, which are probably relay factors of intestinal adaptation. Several authors report an increase in GLP-2, as well as GLP-1 or PYY secretion, in humans suffering from SBS^{122,134} or in murine models of intestinal resection.^{121,122,135} These increases in circulating peptides result in part from the increase in the total number of enteroendocrine cells (due to the intestinal hyperplasia) but also from an increase of enteroendocrine cell capacity to produce hormones.^{121,122} Once again, this functional plasticity depends on the extent of the resection¹³⁵ and the type of anastomosis performed.¹²² Paradoxically, enterohormone production and secretion increase with the extension of the small intestine resection,¹³⁵ as well as with the removal of the ileum and the proximal colon,¹²² both major sites of GLP-1, GLP-2, and PYY production in healthy rats.⁵⁰ As described elsewhere,^{136–138} modifications of microbiota could also play a role in hormonal and trophic adaptations observed in individuals with SBS.

In patients with SBS, intestinal permeability may be compromised, although the mechanism of impaired gut barrier function is still poorly understood. Few studies have directly explored the intestinal permeability in individuals with SBS,^{139–143} and to the authors' knowledge, there are no reports of studies on alteration of TJ properties. Short bowel syndrome predisposes patients to small intestine bacterial overgrowth that could be

responsible for increased intestinal permeability and bacterial translocation, mucosal inflammation, allergic reactions, and villous atrophy,^{144,145} which may further exacerbate nutrient malabsorption. Reduction in gut-associated lymphoid tissue following resection and inhibition of mucosal immunity by total parental nutrition^{103,104,146} certainly contribute to gut barrier alteration in SBS.^{100,147} Specific changes in intestinal permeability in individuals with SBS are mostly related to the clinical conditions or the health of the remnant intestine,^{140–142} rather than adaptation to the resection per se, and may be a limiting factor for intestinal adaptation. The use of probiotics may improve gut barrier function in patients with SBS,^{144,147,148} although more clinical studies to demonstrate its efficacy are needed. Oral nutrition is the gold standard to promote intestinal adaptation and limit complications, and probiotics might provide an associated approach in modulating microbiota to reinforce barrier function.

Finally, in humans, intestinal adaptation in response to extensive intestinal resection may be accompanied by stool reduction and compensatory hyperphagia.¹¹³ This adaptation helps to improve both the structure and function of the residual intestine and can restore normal digestion and absorption capacity of the intestine. Clinicians seek to promote these adaptations because they may allow partial or complete parenteral nutrition weaning.

Bariatric surgeries

The number of bariatric surgery procedures performed in France has tripled since 2006 to reach > 46 000 bariatric surgery procedures in 2016.¹⁴⁹ These procedures include vertical sleeve gastrectomy, Roux-en-Y gastric bypass (RYGB), and one-anastomosis gastric bypass (OAGB) a simplified version of RYGB (Figure 4C). Vertical sleeve gastrectomy consists of resection of two thirds of the stomach, removing the fundus and part of the gastric body, thus it does not directly affect the small intestine but modifies the luminal content and nutrient nature by accelerating gastric emptying and decreasing secretory activity of the stomach. The 2 bypass procedures, on the other hand, profoundly modify the gastrointestinal tract. In addition to the creation of a small gastric pouch, the duodenum and a large part of the jejunum are bypassed from the food circuit, and the chyme is directly discharged from the stomach into a distal part of the jejunum. These surgeries are thus considered as malabsorptive, although intestinal plasticity can compensate for this malabsorption, as detailed below. Very rapidly after the surgery, secretions of enterohormones are modified and exacerbated GLP-1 secretion is suspected to contribute to the metabolic

improvements observed after bariatric surgery, regardless of weight loss.¹⁵⁰

Hyperplasia of the jejunal alimentary limb has been rapidly observed in rat models of RYGB^{151–156} or OAGB.¹⁵⁷ This hyperplasia can increase the absorption capacity of the intestine in a nonspecific way. In agreement with this hypothesis, little or no malabsorption has been reported after RYGB. In contrast, OAGB appears to induce protein malabsorption; in a rat model, an increase in fecal nitrogen losses has been observed, despite an increase in the expression of PEPT1 and numerous amino-acid transporters.¹⁵⁷ Because OAGB induces a direct contact of basic bile secretions with acidic gastric juices, it could result in a pH defect throughout the alimentary limb, affecting the activity of gastric and pancreatic enzymes.

An unexpected adaptation after RYGB, in rats as well as in humans, is the appearance at the basolateral side of enterocytes of the nonintestinal glucose transporter GLUT1.^{154,156} This transporter is characteristic of fetal intestinal cells and cancer cells. It may trigger cellular glucose metabolism changes, leading to an overconsumption of alimentary and blood sugar.¹⁵⁴ This sugar overconsumption by intestinal epithelial cells could contribute to the decrease in blood glucose observed after RYGB.

The modulation in expression levels of SGLT1, GLUT2, and GLUT5 sugar transporters after RYGB is controversial.^{152,154,156,158,159} The heterogeneity of these molecular analyses could be due to experimental differences, such as different postoperative time points, variable surgical procedures, or pre- and postoperative diets. However, the presence of different steps in the adaptive process may also be at play,¹⁵⁶ and an increase in expression of these transporters could be a long-term compensation for the malabsorption induced by the intestinal remodeling. Moreover, expression levels of sugar transporters do not always correlate with intestinal transport of sugars. In 2 RYGB rat models, despite intestinal hyperplasia and increased SGLT1 activity, glucose transport from the intestinal lumen to the blood was not increased because the majority of glucose was retained and consumed within the intestinal tissue itself.^{154,156} Accordingly, low sugar intake by the alimentary loop was also reported in a porcine model of RYGB.¹⁶⁰ The authors suggest that the absence of bile salts, including sodium, in the alimentary limb (induced by the bypass) results in the failure of sodium-dependent SGLT1 activity.¹⁶⁰ However, in this model, the fate of the glucose that did not pass through the blood was not evaluated, and thus it was impossible to distinguish whether it was consumed by the alimentary loop, metabolized by colon microbiota, or excreted in the feces. In humans, analysis of positron emission

tomography and computed tomography scans showed increased [18F]-fluorodeoxyglucose uptake by the intestine, suggesting that blood glucose accumulates in the RYGB-remodeled intestinal segment.¹⁵⁶

After sleeve surgery, there is no jejunal hyperplasia, no aberrant GLUT1 expression, and no increase in glucose consumption by the intestinal tissue.^{156,161} In contrast, transepithelial transport of glucose from the intestinal lumen to the blood measured *ex vivo* in the jejunal loop of operated rats decreased, whereas expression of mRNAs encoding sugar transporters was not modified. The molecular modifications at the origin of this reduction remain to be characterized. In particular, the regulation of the apical location of GLUT2 and its sensitivity to insulin is still unknown after bariatric surgery.

After RYGB, an increase in the total number of cells expressing GIP or GLP-1 has often been reported. This increase is primarily a consequence of the hyperplasia of the alimentary limb because GLP-1-positive cell density is not modified.^{153,156,162,163} The modification of number or density of enteroendocrine cells after OAGB is still to be described. It is assumed that the hyperplasia reported after OAGB¹⁵⁷ will also cause an increase in the number of GLP-1- and GIP-secreting cells and contribute to their increase in secretion. The enteroendocrine cell distribution after sleeve surgery has been studied, and results are controversial because an increase in the density of cells expressing GLP-1 or GIP was reported in 1 murine model¹⁵⁶ but not in another.¹⁶¹ No study has directly investigated this question in humans.

The evaluation of intestinal barrier after bariatric surgery has been reported for only a few studies. In mice, sleeve gastrectomy modifies intestinal permeability in a differential manner between the proximal and distal intestine,¹⁶⁴ and the results are thus difficult to interpret. In humans, 1 study found an increase of the lactulose/mannitol ratio 6 months after Roux-en-Y gastric bypass in 37% of patients; this result was difficult to interpret in term of intestinal permeability because it was associated with an increase of mannitol excretion rate, reflecting long-term mucosal hyperplasia (intestinal adaptation).¹⁶⁵ Changes in other indirect markers of intestinal permeability, such as LPS or LPS transporters, were reviewed in Tuomi and Logomarsino.¹⁶⁶ One study reported the increased expression of several TJ proteins in human proximal small intestinal mucosa after Roux-en-Y gastric bypass surgery, suggesting decreased paracellular permeability.¹⁶⁷ As already reported for other positive outcomes,¹⁶⁸ the beneficial effects of bariatric surgery on intestinal barrier may extend beyond the magnitude of weight loss alone. The impact of bariatric surgery on intestinal barrier function

certainly contributes to the improvement of obese comorbidities and deserves further examination.

To summarize, the plasticity of intestinal absorptive and endocrine cells is essential in the success of weaning parenteral nutrition for patients suffering from SBS. It can also contribute to the effectiveness of bariatric surgery, notably on glucose metabolism.¹⁶⁹ However, this plasticity may also contribute to the side effects of bariatric surgeries. For example, as a result of intestinal adaptation, the exacerbated release of enterohormones like GLP-1 contributes to better insulin secretion but could also be responsible for postprandial hypoglycemia.¹⁷⁰ In addition, adaptation of intestinal absorptive cells could participate in weight regain. Indeed, whereas bypass surgeries are supposed to be malabsorptive, possibly leading to intestinal failure,¹⁷¹ intestinal hyperplasia seems to partially compensate for the malabsorption, preventing undernutrition in response to RYGB and maybe limiting micronutrient deficiencies. The preoperative evaluation of intestinal adaptation capacity could thus help choose the best bariatric procedure for obese patients and improve patient care after surgery.

CONCLUSION

Plasticity of enterocytes or enteroendocrine cells rapidly adjusts intestinal function to an individual's diet and metabolic state. Little is known about the mechanisms at the origin of this cell plasticity, whereas the potential therapeutic applications are huge. In the future, one might imagine stimulating intestinal adaptation to rapidly wean patients from parenteral nutrition in the case of intestinal failure and, conversely, modulating the plasticity of intestinal cells without bariatric surgery to improve the conditions of diabetic obese patients.

Acknowledgments

The authors thank all present and past members of their teams for their invaluable contributions, as well as the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Sorbonne Université, the Ecole Pratique des Hautes Etudes, and Université Paris 7 Diderot for their financial support.

Author contributions. M.L.G. and J.L.B. designed the major concept of the article, wrote the article, and performed the literature search. S.T. additionally contributed to the concept and writing of the article, including the literature search on the intestinal barrier. D.A. provided final versions of the figures with the help of A.-C.J. L.G., L.R.-P., and S.L. contributed to the literature search on bariatric surgery, and F.J. contributed to

the literature search on short bowel syndrome. A.-C.J. and A.B. added valuable input and critical revision of the article. All authors gave final approval of the manuscript to be published.

Funding. D.A. was the recipient of a fellowship from CORDDIM Ile de France. A.-C.J. was recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche. Part of the research was financed by Lactalis Fellowships obtained under the aegis of SFNEP (M.L.G., J.L.B.), FARE by the SNFGE (A.B.), research prizes from the Société Francophone du Diabète (M.L.G.), and from the Institut Benjamin Delessert (M.L.G., L.G.), Fondation pour la Recherche Médicale (L.R.-P.), Groupe Lipides et Nutrition (S.T.), Appert Institute (UPPIA; L.G.), Fondation Obélisque (L.G.), Fondation Nestlé (L.G.), Société Française et Francophone de Chirurgie de l'Obésité et des Maladies Métaboliques (SOFFCO-MM; L.G.), and the Société Française de Chirurgie Digestive (SFCD; L.G.).

Declaration of interest. The authors have no interest to declare.

REFERENCES

1. Reinehr T, Roth CL. The gut sensor as regulator of body weight. *Endocrine*. 2014;49:35–50.
2. Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:19–33.
3. Dailey MJ. Nutrient-induced intestinal adaptation and its effect in obesity. *Physiol Behav*. 2014;136:74–78.
4. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:241–260.
5. Vermeulen L, Snippert HJ. Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:468–480.
6. Raybould HE. Gut microbiota, epithelial function and derangements in obesity. *J Physiol*. 2012;590:441–446.
7. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*. 2016;535:56–64.
8. Ferraris RP, Vinnakota RR. Intestinal nutrient transport in genetically obese mice. *Am J Clin Nutr*. 1995;62:540–546.
9. Mao J, Hu X, Xiao Y, et al. Overnutrition stimulates intestinal epithelium proliferation through catenin signaling in obese mice. *Diabetes*. 2013;62:3736–3746.
10. Ferraris RP, Casirola DM, Vinnakota RR. Dietary carbohydrate enhances intestinal sugar transport in diabetic mice. *Diabetes*. 1993;42:1579–1587.
11. Verdam FJ, Greve JWM, Roosta S, et al. Small intestinal alterations in severely obese hyperglycemic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:E379–E383.
12. Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, et al. Jejunal T cell inflammation in human obesity correlates with decreased enterocyte insulin signaling. *Cell Metab*. 2015;22:113–124.
13. Hughes CA, Dowling RH. Speed of onset of adaptive mucosal hypoplasia and hypofunction in the intestine of parenterally fed rats. *Clin Sci*. 1980;59:317–327.
14. Conour JE, Ganessunker D, Tappenden KA, et al. Acidomucin goblet cell expansion induced by parenteral nutrition in the small intestine of piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283:G1185–G1196.
15. Kansagra K, Stoll B, Rognerud C, et al. Total parenteral nutrition adversely affects gut barrier function in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285:G1162–G1170.
16. Xiao W, Feng Y, Holst JJ, et al. Glutamate prevents intestinal atrophy via luminal nutrient sensing in a mouse model of total parenteral nutrition. *FASEB J*. 2014;28:2073–2087.
17. Lei Q, Bi J, Wang X, et al. GLP-2 prevents intestinal mucosal atrophy and improves tissue antioxidant capacity in a mouse model of total parenteral nutrition. *Nutrients*. 2016;8:33.

18. Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:35–54.
19. Gouyon F, Caillaud L, Carriere V, et al. Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *J Physiol.* 2003;552:823–832.
20. Tobin V, Le Gall M, Fioramonti X, et al. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes.* 2008;57:555–562.
21. Ussar S, Haering M-F, Fujisaka S, et al. Regulation of glucose uptake and enteroendocrine function by the intestinal epithelial insulin receptor. *Diabetes.* 2017;66:886–896.
22. Cohen M, Kitsberg D, Tsytkin S, et al. Live imaging of GLUT2 glucose-dependent trafficking and its inhibition in polarized epithelial cysts. *Open Biol.* 2014;4:doi:10.1098/rsob.140091.
23. Röder PV, Geillinger KE, Zietek TS, et al. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One.* 2014;9:e89977.
24. Schmitt CC, Aranas T, Viel T, et al. Intestinal inactivation of the glucose transporter GLUT2 delays tissue distribution of glucose and reveals an unexpected role in gut homeostasis. *Mol Metab.* 2017;6:61–72.
25. Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M. Carbohydrate intake. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;108:113–127.
26. Shu R, David ES, Ferraris RP. Dietary fructose enhances intestinal fructose transport and GLUT5 expression in weaning rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1997;272:G446–G453.
27. Burant CF, Flink S, DePaoli AM, et al. Small intestine hexose transport in experimental diabetes. Increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. *J Clin Invest.* 1994;93:578–585.
28. Ait-Omar A, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, et al. GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes.* 2011;60:2598–2607.
29. Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, et al. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes.* 2005;54:348–354.
30. El-Zein O, Usta J, Kreydiyyeh SI. The appearance of a leptin effect on glucose absorption in Caco2 cells depends on their differentiation level. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37:491–500.
31. Sakar Y, Nazaret C, Lettérón P, et al. Positive regulatory control loop between gut leptin and intestinal GLUT2/GLUT5 transporters links to hepatic metabolic functions in rodents. *PLoS One.* 2009;4:e7935.
32. Tavernier A, Cavin J-B, Gall ML, et al. Intestinal deletion of leptin signaling alters activity of nutrient transporters and delayed the onset of obesity in mice. *FASEB J.* 2014;28:4100–4110.
33. Singh SK, Bartoo AC, Krishnan S, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulates transepithelial glucose transport. *Obesity.* 2008;16:2412–2416.
34. Cheeseman CI. Upregulation of SGLT-1 transport activity in rat jejunum induced by GLP-2 infusion in vivo. *Am J Physiol.* 1997;273:R1965–R1971.
35. Spanier B. Transcriptional and functional regulation of the intestinal peptide transporter PEPT1. *J Physiol.* 2014;592:871–879.
36. Bröer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev.* 2008;88:249–286.
37. Shiraga T, Miyamoto K, Tanaka H, et al. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology.* 1999;116:354–362.
38. Thamocharan M, Bawani SZ, Zhou X, Adibi SA. Functional and molecular expression of intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) after a brief fast. *Metabolism.* 1999;48:681–684.
39. Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, et al. PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest.* 2001;108:1483–1494.
40. Hindlet P, Bado A, Farinotti R, Buyse M. Long-term effect of leptin on H⁺-coupled peptide cotransporter 1 activity and expression in vivo: evidence in leptin-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323:192–201.
41. Hindlet P, Bado A, Kamenicky P, et al. Reduced intestinal absorption of dipeptides via PepT1 in mice with diet-induced obesity is associated with leptin receptor down-regulation. *J Biol Chem.* 2009;284:6801–6808.
42. Thamocharan M, Bawani SZ, Zhou X, Adibi SA. Hormonal regulation of oligopeptide transporter pept-1 in a human intestinal cell line. *Am J Physiol.* 1999;276:C821–C826.
43. Niot I, Poirier H, Tran TTT, Besnard P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res.* 2009;48:101–115.
44. Petit V, Arnould L, Martin P, et al. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J Lipid Res.* 2007;48:278–287.
45. Béaslas O, Torrelles F, Casellas P, et al. Transcriptome response of enterocytes to dietary lipids: impact on cell architecture, signaling, and metabolism genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295:G942–G952.
46. Lobo MV, Huerta L, Ruiz-Velasco N, et al. Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:1253–1260.
47. Tran TTT, Postal BG, Demignot S, et al. Short term palmitate supply impairs intestinal insulin signaling via ceramide production. *J Biol Chem.* 2016;291:16328–16338.
48. Hein GJ, Baker C, Hsieh J, et al. GLP-1 and GLP-2 as yin and yang of intestinal lipoprotein production. *Diabetes.* 2013;62:373–381.
49. Psichas A, Reimann F, Gribble FM. Gut chemosensing mechanisms. *J Clin Invest.* 2015;125:908–917.
50. Wewer Albrechtsen NJ, Kuhre RE, Toräng S, Holst JJ. The intestinal distribution pattern of appetite- and glucose regulatory peptides in mice, rats and pigs. *BMC Res Notes.* 2016;9:60.
51. Habib AM, Richards P, Cairns LS, et al. Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology.* 2012;153:3054–3065.
52. Gribble FM, Reimann F. Enteroendocrine cells: chemosensors in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:277–299.
53. Pais R, Gribble FM, Reimann F. Stimulation of incretin secreting cells. *Ther Adv Endocrinol.* 2016;7:24–42.
54. Aranas T, Grosfeld A, Poitou C, et al. Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice through improved L-cell differentiation. *J Nutr Sci.* 2015;4:e22.
55. Richards P, Pais R, Habib AM, et al. High fat diet impairs the function of glucagon-like peptide-1 producing L-cells. *Peptides.* 2016;77:21–27.
56. Gniuli D, Calcagno A, Libera LD, et al. High-fat feeding stimulates endocrine, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)-expressing cell hyperplasia in the duodenum of Wistar rats. *Diabetologia.* 2010;53:2233–2240.
57. Bailey CJ, Flatt PR, Kwasowski P, et al. Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide and K cell hyperplasia in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice fed high fat and high carbohydrate cafeteria diets. *Acta Endocrinol.* 1986;112:224–229.
58. Suzuki K, Harada N, Yamane S, et al. Transcriptional regulatory factor X6 (Rfx6) increases gastric inhibitory polypeptide (GIP) expression in enteroendocrine K-cells and is involved in GIP hypersecretion in high fat diet-induced obesity. *J Biol Chem.* 2013;288:1929–1938.
59. Spångéus A, El-Salhy M. Large intestinal endocrine cells in non-obese diabetic mice. *J Diabetes Complications.* 1998;12:321–327.
60. Dusaulyk R, Handgraaf S, Skarupelova S, et al. Functional and molecular adaptations of enteroendocrine L-cells in male obese mice are associated with preservation of pancreatic alpha-cells function and prevention of hyperglycemia. *Endocrinology.* 2016;157:3832–3843.
61. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes.* 2011;60:2775–2786.
62. Petersen N, Reimann F, Bartfeld S, et al. Generation of L cells in mouse and human small intestine organoids. *Diabetes.* 2016;63:410–420.
63. Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017;312:G171–G193.
64. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, et al. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:283–309.
65. Araújo JR, Tomas J, Brenner C, Sansonetti PJ. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie.* 2017;141:97–106.
66. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008;57:1470–1481.
67. Johnson AMF, Costanzo A, Gareau MG, et al. High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PLoS One.* 2015;10:e0122195.
68. Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, Raybould HE. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308:G840–G851.
69. Murakami Y, Tanabe S, Suzuki T. High-fat diet-induced intestinal hyperpermeability is associated with increased bile acids in the large intestine of mice. *J Food Sci.* 2016;81:H216–H222.
70. Kim K-A, Gu W, Lee I-A, et al. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One.* 2012;7:e47713.
71. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299:G440–G448.
72. Shen W, Wolf PG, Carbonero F, et al. Intestinal and systemic inflammatory responses are positively associated with self-identified bacteria abundance in high-fat-fed male C57BL/6J mice. *J Nutr.* 2014;144:1181–1187.
73. Ahmad R, Rah B, Bastola D, et al. Obesity-induces organ and tissue specific tight junction restructuring and barrier deregulation by claudin switching. *Sci Rep.* 2017;7:5125.
74. Ding S, Chi MM, Scull BP, et al. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One.* 2010;5:e12191.

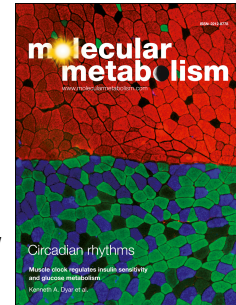
75. Herrmann JR, Turner JR. Beyond Ussing's chambers: contemporary thoughts on integration of transepithelial transport. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;310:C423–C431.
76. Spruss A, Kanuri G, Stahl C, et al. Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. *Lab Invest*. 2012;92:1020–1032.
77. Volynets V, Louis S, Pretz D, et al. Intestinal barrier function and the gut microbiome are differentially affected in mice fed a western-style diet or drinking water supplemented with fructose. *J Nutr*. 2017;147:770–780.
78. Gulhane M, Murray L, Lourie R, et al. High fat diets induce colonic epithelial cell stress and inflammation that is reversed by IL-22. *Sci Rep*. 2016;6:28990.
79. Johansson MEV, Larsson JMH, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(suppl 1):4659–4665.
80. Tomas J, Mulet C, Saffarian A, et al. High-fat diet modifies the PPAR- γ pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E5934–E5943.
81. Guerville M, Leroy A, Sinquin A, et al. Western-diet consumption induces alteration of barrier function mechanisms in the ileum that correlates with metabolic endotoxemia in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017;313:E107–E120.
82. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761–1772.
83. Watson CJ, Hoare CJ, Garrod DR, et al. Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *J Cell Sci*. 2005;118:5221–5230.
84. Guerville M, Boudry G. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;311:G1–G15.
85. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, et al. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*. 2009;50:90–97.
86. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:1286–1292.
87. Laugerette F, Vors C, Peretti N, Michalski M-C. Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. *Biochimie*. 2011;93:39–45.
88. Amar J, Chabo C, Waget A, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med*. 2011;3:559–572.
89. Neal MD, Leaphart C, Levy R, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol*. 2006;176:3070–3079.
90. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012;489:242–249.
91. Winer DA, Winer S, Dranse HJ, Lam TKT. Immunologic impact of the intestine in metabolic disease. *J Clin Invest*. 2017;127:33–42.
92. Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:19.
93. Lam YY, Ha CWY, Campbell CR, et al. Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2012;7:e34233.
94. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G518–G525.
95. Stenman LK, Holma R, Gylling H, Korpela R. Genetically obese mice do not show increased gut permeability or faecal bile acid hydrophobicity. *Br J Nutr*. 2013;110:1157–1164.
96. Kless C, Müller VM, Schüppel VL, et al. Diet-induced obesity causes metabolic impairment independent of alterations in gut barrier integrity. *Mol Nutr Food Res*. 2015;59:968–978.
97. Le Dréan G, Segain J-P. Connecting metabolism to intestinal barrier function: the role of leptin. *Tissue Barriers*. 2014;2:e970940.
98. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*. 2018;359:1376–1383.
99. Boza JJ, Mönnöz D, Vuichoud J, et al. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr*. 1999;129:1340–1346.
100. Genton L, Cani PD, Schrenzel J. Alterations of gut barrier and gut microbiota in food restriction, food deprivation and protein-energy wasting. *Clin Nutr*. 2015;34:341–349.
101. Yang H, Feng Y, Sun X, Teitelbaum DH. Enteral versus parenteral nutrition: effect on intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1165:338–346.
102. Nakasaki H, Mitomi T, Tajima T, et al. Gut bacterial translocation during total parenteral nutrition in experimental rats and its countermeasure. *Am J Surg*. 1998;175:38–43.
103. Pierre JF, Heneghan AF, Tsao FHC, et al. Route and type of nutrition and surgical stress influence secretory phospholipase A2 secretion of the murine small intestine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2011;35:748–756.
104. Heneghan AF, Pierre JF, Tandee K, et al. Parenteral nutrition decreases paneth cell function and intestinal bactericidal activity while increasing susceptibility to bacterial enteroinvasion. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2014;38:817–824.
105. Teixeira TFS, Souza NCS, Chiarello PG, et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clin Nutr*. 2012;31:735–740.
106. Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *Am J Clin Nutr*. 2017;105:127–135.
107. Brignardello J, Morales P, Diaz E, et al. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32:1307–1314.
108. Basu S, Haghiac M, Surace P, et al. Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19:476–482.
109. Vors C, Pineau G, Drai J, et al. Postprandial endotoxemia linked with chylomicrons and lipopolysaccharides handling in obese versus lean men: a lipid dose-effect trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:3427–3435.
110. Ott B, Skurk T, Hastreiter L, et al. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. *Sci Rep*. 2017;7:11955.
111. Genser L, Aguanno D, Soula HA, et al. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. *J Pathol*. 2018;246:217–230.
112. Rahman K, Desai C, Iyer SS, et al. Loss of junctional adhesion molecule a promotes severe steatohepatitis in mice on a diet high in saturated fat, fructose, and cholesterol. *Gastroenterology*. 2016;151:733–746.e12.
113. Billiauws L, Corcos O, Joly F. What's new in short bowel syndrome? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018;21:313–318.
114. Joly F, Baxter J, Staun M, et al. Five-year survival and causes of death in patients on home parenteral nutrition for severe chronic and benign intestinal failure. *Clin Nutr*. 2018;37:1415–1422.
115. Pironi L, Arends J, Bozzetti F, et al. ESPEN guidelines on chronic intestinal failure in adults. *Clin Nutr*. 2016;35:247–307.
116. Booth CC, Evans KT, Menzies T, Street DF. Intestinal hypertrophy following partial resection of the small bowel in the rat. *Br J Surg*. 1959;46:403–410.
117. Lauronen J, Pakarinen MP, Kuusanmäki P, et al. Intestinal adaptation after massive proximal small-bowel resection in the pig. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:152–158.
118. Martin GR, Wallace LE, Sigalet DL. Glucagon-like peptide-2 induces intestinal adaptation in parenterally fed rats with short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:G964–G972.
119. McDuffie LA, Bucher BT, Erwin CR, et al. Intestinal adaptation after small bowel resection in human infants. *J Pediatr Surg*. 2011;46:1045–1051.
120. Joly F, Mayeur C, Messing B, et al. Morphological adaptation with preserved proliferation/transporter content in the colon of patients with short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297:G116–G123.
121. Dahly EM, Gillingham MB, Guo Z, et al. Role of luminal nutrients and endogenous GLP-2 in intestinal adaptation to mid-small bowel resection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284:G670–G682.
122. Gillard L, Billiauws L, Stan-luga B, et al. Enhanced ghrelin levels and hypothalamic orexigenic AgRP and NPY neuropeptide expression in models of jejuno-colonic short bowel syndrome. *Sci Rep*. 2016;6:28345.
123. Gillingham MB, Kritsch KR, Murali SG, et al. Resection upregulates the IGF-1 system of parenterally fed rats with jejuno-colic anastomosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281:G1158–G1168.
124. Koopmann MC, Liu X, Boehler CJ, et al. Colonic GLP-2 is not sufficient to promote jejunal adaptation in a PN-dependent rat model of human short bowel syndrome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2009;33:629–638; discussion 638–639.
125. O'Brien DP, Nelson LA, Huang FS, Warner BW. Intestinal adaptation: structure, function, and regulation. *Semin Pediatr Surg*. 2001;10:56–64.
126. Helmrath MA, Fong JJ, Dekaney CM, Henning SJ. Rapid expansion of intestinal secretory lineages following a massive small bowel resection in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G215–G222.
127. Iqbal CW, Qandeel HG, Zheng Y, et al. Mechanisms of ileal adaptation for glucose absorption after proximal-based small bowel resection. *J Gastrointest Surg*. 2008;12:1854–1864; discussion 1864–1865.
128. Sigalet DL, Martin GR. Mechanisms underlying intestinal adaptation after massive intestinal resection in the rat. *J Pediatr Surg*. 1998;33:889–892.
129. Hines OJ, Bilchik AJ, Zinner MJ, et al. Adaptation of the Na⁺/glucose cotransporter following intestinal resection. *J Surg Res*. 1994;57:22–27.
130. Kato Y, Yu D, Schwartz MZ. Hepatocyte growth factor up-regulates SGLT1 and GLUT5 gene expression after massive small bowel resection. *J Pediatr Surg*. 1998;33:13–15.
131. Ziegler TR, Fernández-Estívariz C, Gu LH, et al. Distribution of the H⁺/peptide transporter PepT1 in human intestine: up-regulated expression in the colonic

- mucosa of patients with short-bowel syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:922–930.
132. Musch MW, Bookstein C, Rocha F, et al. Region-specific adaptation of apical Na/H exchangers after extensive proximal small bowel resection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283:G975–G985.
 133. Tsujikawa T, Itoh A, Fukunaga T, et al. Alteration of aquaporin mRNA expression after small bowel resection in the rat residual ileum and colon. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18:803–808.
 134. Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, et al. Elevated plasma glucagon-like peptide 1 and 2 concentrations in ileum resected short bowel patients with a preserved colon. *Gut.* 2000;47:370–376.
 135. Martin GR, Wallace LE, Hartmann B, et al. Nutrient-stimulated GLP-2 release and crypt cell proliferation in experimental short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G431–G438.
 136. Mayeur C, Gillard L, Le Beyec J, et al. Extensive intestinal resection triggers behavioral adaptation, intestinal remodeling and microbiota transition in short bowel syndrome. *Microorganisms.* 2016;4:16.
 137. Gillard L, Mayeur C, Robert V, et al. Microbiota is involved in post-resection adaptation in humans with short bowel syndrome. *Front Physiol.* 2017;8:224.
 138. Billiauw L, Thomas M, Le Beyec-Le Bihan J, Joly F. Intestinal adaptation in short bowel syndrome. What is new? *Nutr Hosp.* 2018;35:731–737.
 139. Wu J, Chen J, Wu W, et al. Enteral supplementation of bovine lactoferrin improves gut barrier function in rats after massive bowel resection. *Br J Nutr.* 2014;112:486–492.
 140. D'Antiga L, Dhawan A, Davenport M, et al. Intestinal absorption and permeability in paediatric short-bowel syndrome: a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;29:588–593.
 141. Sentongo TA, Cohran V, Korff S, et al. Intestinal permeability and effects of *Lactobacillus rhamnosus* therapy in children with short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46:41–47.
 142. Martin GR, Meddings JB, Sigalet DL. 3-O methylglucose absorption in vivo correlates with nutrient absorption and intestinal surface area in experimental short bowel syndrome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2003;27:65–70.
 143. Lim DW, Levesque CL, Vine DF, et al. Synergy of glucagon-like peptide-2 and epidermal growth factor coadministration on intestinal adaptation in neonatal piglets with short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017;312:G390–G404.
 144. Goulet O, Joly F. [Intestinal microbiota in short bowel syndrome]. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010;34(suppl 1):S37–S43.
 145. Cole CR, Ziegler TR. Small bowel bacterial overgrowth: a negative factor in gut adaptation in pediatric SBS. *Curr Gastroenterol Rep.* 2007;9:456–462.
 146. Buchman AL, Moukarzel AA, Bhuta S, et al. Parenteral nutrition is associated with intestinal morphologic and functional changes in humans. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1995;19:453–460.
 147. Stoidis CN, Misiakos EP, Patapis P, et al. Potential benefits of pro- and prebiotics on intestinal mucosal immunity and intestinal barrier in short bowel syndrome. *Nutr Res Rev.* 2011;24:21–30.
 148. Reddy VS, Patole SK, Rao S. Role of probiotics in short bowel syndrome in infants and children—a systematic review. *Nutrients.* 2013;5:679–699.
 149. Debs T, Petruccianni N, Kassir R, et al. Trends of bariatric surgery in France during the last 10 years: analysis of 267, 466 procedures from 2005–2014. *Surg Obes Relat Dis.* 2016;12:1602–1609.
 150. Salehi M, D'Alessio DA. Effects of glucagon like peptide-1 to mediate glycaemic effects of weight loss surgery. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15:171–179.
 151. Bueter M, Löwenstein C, Olbers T, et al. Gastric bypass increases energy expenditure in rats. *Gastroenterology.* 2010;138:1845–1853.
 152. Taqi E, Wallace LE, de Heuvel E, et al. The influence of nutrients, biliary-pancreatic secretions, and systemic trophic hormones on intestinal adaptation in a Roux-en-Y bypass model. *J Pediatr Surg.* 2010;45:987–995.
 153. Mumphy MB, Patterson LM, Zheng H, Berthoud H-R. Roux-en-Y gastric bypass surgery increases number but not density of CCK-, GLP-1-, 5-HT-, and neurotensin-expressing enteroendocrine cells in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2013;25:e70–e79.
 154. Saeidi N, Meoli L, Nestoridi E, et al. Reprogramming of intestinal glucose metabolism and glycemic control in rats after gastric bypass. *Science.* 2013;341:406–410.
 155. Hansen CF, Bueter M, Theis N, et al. Hypertrophy dependent doubling of L-cells in Roux-en-Y gastric bypass operated rats. *PLoS One.* 2013;8:e65696.
 156. Cavin J-B, Couvelard A, Lebtahi R, et al. Differences in alimentary glucose absorption and intestinal disposal of blood glucose after Roux-en-Y gastric bypass vs sleeve gastrectomy. *Gastroenterology.* 2016;150:454–464.e9.
 157. Cavin J-B, Voitelier E, Cluzeaud F, et al. Malabsorption and intestinal adaptation after one anastomosis gastric bypass compared to Roux-en-Y gastric bypass in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;311:G492–G500.
 158. Stearns AT, Balakrishnan A, Tavakkolizadeh A. Impact of Roux-en-Y gastric bypass surgery on rat intestinal glucose transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297:G950–G957.
 159. Nguyen NQ, Debreceeni TL, Bambrick JE, et al. Upregulation of intestinal glucose transporters after Roux-en-Y gastric bypass to prevent carbohydrate malabsorption. *Obesity (Silver Spring).* 2014;22:2164–2171.
 160. Baud G, Daoudi M, Hubert T, et al. Bile diversion in Roux-en-Y gastric bypass modulates sodium-dependent glucose intestinal uptake. *Cell Metab.* 2016;23:547–553.
 161. Mumphy MB, Hao Z, Townsend RL, et al. Sleeve gastrectomy does not cause hypertrophy and reprogramming of intestinal glucose metabolism in rats. *Obes Surg.* 2015;25:1468–1473.
 162. Nergård BJ, Lindqvist A, Gislason HG, et al. Mucosal glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide cell numbers in the super-obese human foregut after gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis.* 2015;11:1237–1246.
 163. Rhee NA, Wahlgren CD, Pedersen J, et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on the distribution and hormone expression of small-intestinal enteroendocrine cells in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2015;58:2254–2258.
 164. Blanchard C, Moreau F, Chevalier J, et al. Sleeve gastrectomy alters intestinal permeability in diet-induced obese mice. *Obes Surg.* 2017;27:2590–2598.
 165. Savassi-Rocha AL, Diniz MTC, Vilela EG, et al. Changes in intestinal permeability after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg.* 2014;24:184–190.
 166. Tuomi K, Logomarsino JV. Bacterial lipopolysaccharide, lipopolysaccharide-binding protein, and other inflammatory markers in obesity and after bariatric surgery. *Metab Syndr Relat Disord.* 2016;14:279–288.
 167. Casselbrant A, Elias E, Fändriks L, Wallenius V. Expression of tight-junction proteins in human proximal small intestinal mucosa before and after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis.* 2015;11:45–53.
 168. Pareek M, Schauer PR, Kaplan LM, et al. Metabolic surgery: weight loss, diabetes, and beyond. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71:670–687.
 169. Cavin JB, Bado A, Le Gall M. Intestinal adaptations after bariatric surgery: consequences on glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28:354–364.
 170. Poitou C, Bouaziz-Amar E, Genser L, et al. Fasting levels of glicentin are higher in Roux-en-Y gastric bypass patients exhibiting postprandial hypoglycemia during a meal test. *Surg Obes Relat Dis.* 2018;14:929–935.
 171. Corcos O, Cazals-Hatem D, Durand F, et al. Intestinal failure after bariatric surgery. *Lancet.* 2013;382:742.

Journal Pre-proof

AHR activation defends gut barrier integrity against damage occurring in obesity

Barbara G. Postal, Sara Ghezzal, Doriane Aguardo, Sébastien André, Kevin Garbin, Laurent Genser, Edith Brot-Laroche, Christine Poitou, Hédi Soula, Amelle Leturque, Karine Clément, Véronique Carrière



PII: S2212-8778(20)30081-8

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101007>

Reference: MOLMET 101007

To appear in: *Molecular Metabolism*

Received Date: 20 January 2020

Revised Date: 3 April 2020

Accepted Date: 22 April 2020

Please cite this article as: Postal BG, Ghezzal S, Aguardo D, André S, Garbin K, Genser L, Brot-Laroche E, Poitou C, Soula H, Leturque A, Clément K, Carrière V, **AHR activation defends gut barrier integrity against damage occurring in obesity**, *Molecular Metabolism*, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101007>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier GmbH.

Journal Pre-proof

2/TC7 cells. PKC and p38MAPK signaling pathways were involved in this AhR action. Conclusion: The results of these series of human, mouse and cell culture experiments show a protective effect of AhR activation in the intestine targeting particularly tight junctions and cytokine expression. We propose that AhR constitutes a valuable target to protect intestinal functions in metabolic diseases, which can be achieved in the future via food or drug ligands.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor, intestine, cell junction, permeability, signaling

1. INTRODUCTION

The development of obesity is characterized by a progressive aggravation of systemic low-grade inflammation together with metabolic deterioration. Inflammation in obese subject also occurs in tissues such as adipose tissue [1; 2], liver [3] and the small intestine [4]. During obesity, adipose tissue contributes to inflammation directly in the systemic vascular system but also, when accumulated in visceral depot, through the portal vein via the release of free fatty acids, cytokines and adipokines [5]. Recent reports highlighted the role of intestine as an early contributor to low-grade inflammation. Studies in mouse models of high-fat diet induced obesity suggested that the passage of bacterial components such as lipopolysaccharides (LPS) from the intestinal lumen into the circulation promotes the systemic inflammation through mechanisms involving intestinal barrier damage [6-8]. Intestinal permeability was increased during the first week of high-fat diet in mice [9; 10] and, as we recently demonstrated, after a single gavage with palm oil [11]. These latter results suggested that intestinal barrier defects might precede the onset of obesity. In human, we showed that higher accumulation of T lymphocytes density in jejunal epithelium of obese patients compared to non-obese subjects was associated with markers of systemic inflammation [4]. In the fasting state, subtle alterations of intestinal barrier were evidenced in jejunum samples of subjects with severe obesity and these alterations were further enhanced after an *ex-vivo* lipid challenge [12]. The patient susceptibility to lipid-induced barrier defect was correlated with both intestinal and systemic inflammation. Altogether these studies established a link between intestinal barrier and low-grade inflammation in obesity, and the molecular actors that orchestrate this relationship need to be deciphered.

Several data highlight the role of AhR in metabolic diseases and inflammation. The aryl hydrocarbon receptor (AhR), a transcriptional factor acting as an environmental chemical sensor, was first extensively studied for its role in the metabolism of xenobiotics [13; 14]. Investigations using AhR knockout mouse model unveiled its important role in the development and control of the immune system [15]. In the gut, a protective role of AhR in inflammation or barrier injury has been reported. It seems to be related to its role in the differentiation of intraepithelial lymphocytes and in the modulation of innate lymphoid cells [15]. In human, a loss of protective function of AhR was proposed to occur in intestinal bowel diseases, which was linked to reduced production of AhR agonists by individual gut microbiota [16]. A beneficial effect of AhR agonist on intestinal barrier in mouse models or in intestinal cells submitted to inflammatory stresses has been reported [17; 18]. In

metabolic diseases contradictory results were obtained concerning the importance of AhR tone. Recent reports showed that AhR deficient mice were protected from diet-induced obesity and associated metabolic disorders such as insulin-resistance and hepatic steatosis [19; 20]. Conversely, the activation of AhR using genetic mouse models or specific ligands such as TCDD promoted hepatic steatosis [21; 22]. This deleterious impact of AhR activation is in contrast with reported protective role of AhR in liver steatosis in mice [23; 24]. Moreover, in human low levels in feces of AhR agonists were associated with metabolic syndrome, type 2 diabetes, increased body mass index and blood pressure [24].

Combining a series of human studies, *in vivo* mouse models and *in vitro* analyses, we aim at determining the potential implication of AhR in the intestinal inflammation and barrier dysfunction reported in obesity.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Human subjects, Clinical and biological characteristics

This study is ancillary to two previously published studies [12; 25] that included population of patient with severe obesity involved in a bariatric surgery program (Roux-en-Y gastric bypass), occurring at the Pitié-Salpêtrière University Hospital, Nutrition and visceral surgery departments, Paris, France. Non-obese subjects underwent pancreaticoduodenectomy or gastrectomy allowing access to proximal jejunal samples. For this study purpose, a subgroup of 36 subjects including 26 severely obese and 10 non-obese subjects, were selected being free of diabetes based on international definition and with no personal or familial history of inflammatory bowel disease. Their levels of white blood count were under 10.109/mm³ and of CRP inferior to 5 mg/l. We excluded non-obese subjects with renal-cardiac- or hepatic failure. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, received approval from the local ethics committee (CPP Ile de France I) and was registered as number NCT02292121 on the ClinicalTrials.gov website. Informed written consent was obtained from patients prior to study inclusion. Medical history and clinical variables were recorded for non-obese and obese patients before surgery as described in [12]. Venous blood samples were collected after a 12-h fast for routine assessment of biological metabolic as previously described [26]. Insulin resistance was assessed using the HOMA-IR index [insulinemia (mIU/L) x fasting blood glucose (mmol/L)/22.5]. The clinical characteristics of non-obese and severely obese patients included in this study are provided in table 1. Due to the unequal gender distribution between our control and obese groups and in order to avoid experimental bias, correlations between AhR/AhR target genes and CD3⁺ T lymphocytes were performed only within the obese group and only with female subjects.

2.2 Human jejunum tissue sampling, epithelium cell preparation and analyses

Proximal jejunum samples from obese subjects and non-obese subjects were collected during surgery, conditioned and transported as described [4]. Briefly, proximal jejunal samples (60–70 cm distal to the

ligament of Treitz) were collected from surgical waste (4 cm). Tissue was rapidly opened, washed in DMEM (1g Glucose Glutamax + pyruvate + 10% SVF + 1% Penicilline/Streptomycine) and kept at 4°C before cell isolation, fixation and paraffin imbedding, or freezing at -80°C.

Immunohistology of jejunum (5 µm paraffin-embedded tissue sections) was performed using anti-CD3 polyclonal antibody (A0452, DAKO, Agilent Technologies, Les Ulis, France). Primary antibody or secondary antibody were incubated for 1h at room temperature and revealed with a streptavidin biotin peroxidase kit (GMR4-61, BioSpa Milan, Italy), DAB staining (DAKO, Agilent technologies), and nuclei hematoxylin counterstaining (Vector, Eurobio, les Ulis, France). Images were obtained by conventional microscopy. Lamina propria and epithelial immune cell densities (cell/mm²), excluding lymphoid structures, were analyzed in longitudinal sections of mucosa in two to four fields (ImageJ 1.46c).

Preparation of epithelial cell fraction from intestinal mucosa was obtained as described in [4]. Briefly, the jejunal mucosa was dissected and minced prior incubation in chelating buffer (5mM EDTA, 2mM DDT, PBS; at 37°C for 20 min). Released epithelial cells were filtered through 70µm mesh cell strainers, centrifuged (600g at 4°C for 5min), and recovered in complete DMEM (10% FCS, 1% Penicilline/Streptomycine). Total RNA was extracted from epithelial fractions with the RNAeasy Mini kit (QIAGEN, Thermofischer scientific, Illkirch, France). RNA concentration and quality were assessed (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) before reverse transcription of total RNA (Applied Biosystems, Thermofischer scientific). qPCR analyses were performed using Taqman Low Density Arrays (Thermofischer scientific) according to the manufacturer's procedures with the following gene assay IDs : *AhR* (Hs00907314_m1), *AhRR* (Hs01005075_m1), *CYP1A1* (Hs01054797_g1), *CYP1B1* (Hs00164383_m1) and *IL22* (Hs01574154_m1). Results were normalized to the geometric mean of ribosomal 18S (Hs99999901_s1) and peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B, Hs00168719_m1) values.

2.3 Mouse treatments and *in vivo* intestinal permeability

Three-month-old male C57BL/6JRj mice (Janviers labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were fed *ad libidum* a standard chow diet (A03, SAFE, Augy, France) during the experiments. Mice were kept with the artificial light-dark cycle 12:12h with lights on 07:00h. Mice were forced-fed with 0.2ml of water, palm oil (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) or βNF (40mg/kg, Sigma-Aldrich) dissolved in palm oil for 4 consecutive days at 6pm just before the feeding period of mice. For *in vivo* intestinal permeability measurement, fed mice were successively force-fed the 5th day of the experiment, with 0.2ml of palm oil or βNF dissolved in palm oil followed by 0.2ml of 4kDa FITC-dextran solution (Sigma-Aldrich, 0.5mg/g of mice in water) at 9:00h. No significant change in the weight of the animals was observed whatever the treatment. Mice were anesthetized and then euthanized 1 hour after the last gavage. Blood and jejunum were collected. FITC-dextran

Journal Pre-proof

Journal Pre-proof

MARVELD2 700191; Thermofischer scientific), and rabbit anti-occludin (1:25; 71-1500; Thermofischer scientific). Secondary antibodies and reagents used were provided in the separation and detection module kits (ProteinSimple). Junction proteins levels were normalized to Hsc70 (1:100; sc7298 Santa Cruz, Clinisciences Nanterre, France).

2.10 Statistical analysis

Values were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Two group comparisons were performed using Student's T-test (quantitative variables) or chi-square test (categorical variables). Comparisons involving multiple groups were done using one-way analysis of variance (ANOVA). Pearson correlations adjusted for age and BMI were determined using R software (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). A level of $p < 0.05$ was considered as significant.

3. RESULTS

3.1 Increased CD3⁺ T cell density in intestinal epithelium negatively correlates with expression of AhR gene targets in severe obesity.

We evaluated intestinal inflammation in non-obese and subjects with severe obesity by quantifying the density of CD3⁺ T lymphocytes in jejunum mucosa. The epithelial to lamina propria (Epi/LP) ratio allowed quantifying the T lymphocyte recruitment in the epithelium (Figure 1A). We showed a significantly higher CD3 Epi/LP ratio in obese than in non-obese subjects ($p < 0.0209$). A heterogeneous distribution of CD3 Epi/LP ratio was observed within the obese cohort. To study the relevance of AhR activity in the heterogeneity of intestinal inflammation within the obese cohort, we determined in epithelial cell fraction from the same jejunum samples, the expression of AhR and of its well-known target genes (CYP1A1, CYP1B1) as well as the recently identify AhR-target gene, IL-22 [34]. We observed strong significant negative relationships between AhR, CYP1A1, IL-22 mRNA levels and CD3 Epi/LP ratios in female obese subjects (Figure 1B-D). CYP1B1 mRNA levels and CD3 Epi/LP ratio showed also a trend ($p = 0.060$) toward a negative correlation (Figure 1E). However, the level of AhR repressor (AhRR) involved in the feedback regulation of AhR signaling [35] was not correlated with intestinal inflammatory cell accumulation (Figure 1F).

These results showing a negative correlation between intestinal inflammation and AhR activity in human obesity, prompted us to examine further AhR activity in this context.

3.2 AhR activation protects intestinal junctional complexes during lipid load in mice.

Inflammation and intestinal permeability are experimentally linked. In obesity and in high-fat diet-induced models of obesity, an inflammation in several tissues and endotoxemia were observed, as well as low-grade systemic inflammation. All these factors can contribute to alter intestinal permeability; in particular circulating activated immune cells that secrete pro-inflammatory cytokines

are known to alter cell-cell junctions [36]. We previously observed that 1-5 repeated gavages with palm oil in mice are sufficient to reproduce part of the events occurring in high fat-induced obesity models. They induce a disruption of the intestinal barrier integrity and initiate intestinal inflammation, but without obvious systemic inflammation [11]. This short-term treatment with palm oil allows us to get more direct and local effects on the intestine targeting gut permeability. We investigated the effect of AhR activation in this mouse model of lipid-induced impairment of intestinal epithelial barrier. Mice were force-fed with palm oil alone or in combination with β -naphthoflavone (β NF), a potent AhR agonist (Figure 2). As expected, β NF administration markedly increased the expression of AhR target genes CYP1A1 and CYP1A2 in the jejunum (Figure 2A). Importantly, we observed that palm oil feeding impaired tight junction integrity, as shown by the loss of signal of ZO-1, occludin and tricellulin at tight junctions (Figure 2B). The activation of AhR activity by β NF partially restored the localization of these proteins at the membrane (Figure 2B). However, the administration of β NF did not prevent the increase of intestinal permeability to macromolecules (determined by the measure of FITC-dextran 4kDa) induced by palm oil (Figure 2C), suggesting that the partial restoration of cell-cell junction was not sufficient to maintain barrier integrity. Nevertheless, these results suggest a protective role for AhR on intestinal epithelium through a direct impact on cell-cell junctions.

3.3 AhR activation prevents chemically induced damages of barrier integrity in intestinal epithelial cells.

We further investigated the role of AhR on cell-cell junctions in the intestinal epithelium monolayer and examined the effect of AhR activation after barrier damage in the human intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line. Chemical disruption of cell-cell junction was induced by EGTA a calcium chelator known to alter barrier permeability [37]. We first wanted to determine whether AhR activation could prevent the loss of barrier integrity induced by EGTA (Figure 3). Caco-2/TC7 cells were treated for 4 days with β NF and EGTA was added during the last 4h of the experiment. As expected, the treatment of Caco-2/TC7 cells with β NF increased the mRNA level of the AhR target gene CYP1A1 (Figure 3A). While the permeability to macromolecules measured by the passage of FITC-dextran 4kDa was increased upon chemically induced barrier damage, this increase was not modified in the presence of β NF (Figure 3B). Unexpectedly, a small increase of FITC-dextran 4kDa flux was observed when the cells were incubated with β NF alone. We then studied the effects of AhR activation on paracellular permeability to ions measured by the determination of transepithelial resistance (TEER). As awaited, chemically induced barrier damage decreased TEER denoting an enhanced permeability to ions (Figure 3C). We showed that β NF prevented the chemically induced barrier damage by maintaining TEER to control values. A reinforcement of TEER was also noticed when the cells were incubated with β NF alone. We analyzed by immunofluorescence and western blot the localization and the expression of the tight junction proteins ZO-1, occludin and tricellulin in cells,

Journal Pre-proof

Caco-2/TC7 cells. Cells were pre-incubated, and then treated daily for 4 consecutive days, with specific inhibitors of protein kinases C (Ro 31-8220) or p38MAP kinase (SB203580) or ERK1/2 (U0126) one hour before the addition of β NF. Chemical barrier damage was induced for the last 4 hours of treatment. We confirmed that barrier damage was associated with a decrease of TEER that was counteracted in presence of the AhR agonist. We further showed that the maintenance of TEER by β NF treatment in barrier-damaged cell monolayer did not occur when the cells were pretreated with Ro 31-8220 (Figure 5A) or with SB203580 (Figure 5B). However, in the absence of β NF treatment, we found a decrease of TEER in presence of Ro 31-8220 in chemically damaged epithelial barrier (Figure 5A), indicating that the inhibition of protein kinase C was sufficient to modify TEER. As Ro 31-8220 can also inhibit protein kinase A and GSK3 β , we cannot exclude the participation of these protein kinases in the effects of β NF. Contrary to the effects of PKC and p38MAPK inhibitors, the inhibition of protein kinase ERK1/2 by U0126 treatment did not block the β NF-dependent maintaining of TEER to control value (Figure 5C). No toxic effect of treatments (assessed through the measure of lactate dehydrogenase release in the medium) was observed (Figure 5D).

These results suggest a potential implication of PKC and p38MAPK in the protective effect of β NF on intestinal permeability to ions (TEER).

4. DISCUSSION

Combining human studies, mouse *in vivo* investigation and cell culture model of human enterocytes, we showed that the transcriptional factor AhR is an important contributor of intestinal barrier maintenance (Figure 6).

We here showed a negative correlation between the expression of AhR target genes and inflammation in jejunum samples from subjects with obesity. This observation suggests that low AhR activity is linked to low-grade inflammation in human obesity. This potential decrease of AhR tone in obesity may be related to several mediators, including changes in gut microbiota composition. It was reported that endogenous AhR ligands are produced by intestinal bacteria, by metabolizing nutrients such as tryptophan and butyrate, a short chain fatty acid that can activate the intestinal AhR tone [44]. Intestinal inflammation and changes in fecal microbiota composition of subjects suffering from intestinal bowel diseases were associated with low level of fecal AhR ligands [16]. The diet supplementation with *Lactobacillus* strains, which display a high natural capacity to produce AhR ligands, improved the metabolic impairments induced by the high fat diet [24; 45] or reduced the severity of chemically induced colitis in mice [16]. However, obesity is often associated with an increased fecal abundance of *Lactobacillus* species [46-48], thus one wonder whether this change in abundance is accompanied by an increase in the function of this bacterial species. Indeed, low levels of AhR ligands in feces were correlated with high corpulence in human [24]. Moreover, *Lactobacillus*

Journal Pre-proof

5. CONCLUSION

Our study shows an important protective role of AhR on intestinal barrier integrity including preserved cell-cell junctions and down-regulation of inflammatory markers. This indicates that in obesity this integrity might be altered through an imbalance between AhR tone and low-grade inflammation. The lower AhR activity in intestine may thus contribute to local and systemic inflammation through a loss of intestinal barrier integrity in obesity. AhR agonist administration via food or drugs constitutes a therapeutic strategy to protect intestinal functions in metabolic diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff involved in human bariatric surgery program: V Lemoine (clinical research assistant ICAN) for help in clinical investigation, Dr F. Marchelli (NutriOmic team) for data management, ICAN CRB members for contribution to bio-banking and Dr A. Torcivia for support in surgical jejunum samples collection. We thank the staff in charge of animal housing and care at the animal core facility of the Centre d'Explorations Fonctionnelles at the Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France. This project benefited from the facilities of the CHIC platform (Centre de Recherche des Cordeliers). We thank Dr Furuse (National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan) for kindly providing us antibodies directed against occludin and tricellulin. We thank S. Thenet (Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, France) for its constant support.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FUNDING

The clinical study was promoted by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP) and Direction of Clinical research, which promoted the clinical investigations (Microbaria and Leaky gut projects) and benefited from institution support (INSERM, Sorbonne University and EPHE). This work has also benefited from a French government funding managed by the ICAN institute as transversal leaky gut project, the National Agency for Research (program "Investments for the Future" reference ANR -10-IAHU, RHU Carmma), from funds link to the FP7-investigation program (Metacardis) and obtained by Benjamin Delessert Institute, Groupe Lipides et Nutrition (GLN), Appert Institute (UPPIA), Fondation Obélisque, Fondation Nestlé, Société Française et Francophone de Chirurgie de l'Obésité et des Maladies Métaboliques (SOFFCO-MM), Société Française de Chirurgie Digestive (SFCD) (for Leaky Gut project). Funds were also obtained from the Science Without Border program of the Brazilian government and of which B.G.P. is recipient of doctoral fellowship CNPq 207303/2014-2. S.G. received a doctoral fellowship from Sorbonne Université, Paris, France. D.A. was the recipient of a fellowship from CORDDIM Ile de France.

AUTHORS CONTRIBUTION

B.G.P, S.G. and V.C. designed and conducted the experiments and analyzed the data. D.A. developed acquisition of tight junctions images using apotome and the analysis of these proteins with Simple Westems™. K.G., S.A., E.B.L. conducted CD3 labeling and quantification on human jejunum samples. H.S. performed statistical analyses. C.P. and K.C. coordinated clinical investigation. L.G. performed the patient surgery. C.P. and K.C. contributed to subject recruitment, patient phenotyping and sample collection. V.C. wrote the paper. B.G.P., C.P., K.C., H.S., D.A. and A.L. revised the manuscript versions. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

ABBREVIATIONS AND NOMENCLATURE

βNF: β-naphthoflavone; DDT: Dithiothreitol; FCS: fetal calf serum; FITC-dextran: Fluorescein isothiocyanate-dextran;

REFERENCES

- [1] Stolarczyk, E., 2017. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol* 37:35-40.
- [2] Reilly, S.M., Saltiel, A.R., 2017. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* 13(11):633-643.
- [3] Loomis, A.K., Kabadi, S., Preiss, D., Hyde, C., Bonato, V., St Louis, M., et al., 2016. Body Mass Index and Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Two Electronic Health Record Prospective Studies. *J Clin Endocrinol Metab* 101(3):945-952.
- [4] Monteiro-Sepulveda, M., Touch, S., Mendes-Sa, C., Andre, S., Poitou, C., Allatif, O., et al., 2015. Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab* 22(1):113-124.
- [5] Makki, K., Froguel, P., Wolowczuk, I., 2013. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm* 2013:139239.
- [6] Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., et al., 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57(6):1470-1481.
- [7] Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., et al., 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56(7):1761-1772.
- [8] Araujo, J.R., Tomas, J., Brenner, C., Sansonetti, P.J., 2017. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie* 141:97-106.
- [9] Johnson, A.M., Costanzo, A., Gareau, M.G., Armando, A.M., Quehenberger, O., Jameson, J.M., et al., 2015. High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PLoS One* 10(4):e0122195.
- [10] Hamilton, M.K., Boudry, G., Lemay, D.G., Raybould, H.E., 2015. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308(10):G840-851.
- [11] Ghezzal, S., Postal, B.G., Quevrain, E., Brot, L., Seksik, P., Leturque, A., et al., 2020. Palmitic acid damages gut epithelium integrity and initiates inflammatory cytokine production. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1865(2):158530.
- [12] Genser, L., Aguanno, D., Soula, H.A., Dong, L., Trystram, L., Assmann, K., et al., 2018. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. *J Pathol*.
- [13] Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y., 2017. The aryl hydrocarbon receptor: a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Exp Anim* 66(2):75-89.

- [14] Ramadoss, P., Marcus, C., Perdew, G.H., 2005. Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1(1):9-21.
- [15] Rothhammer, V., Quintana, F.J., 2019. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol* 19(3):184-197.
- [16] Lamas, B., Richard, M.L., Leducq, V., Pham, H.P., Michel, M.L., Da Costa, G., et al., 2016. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* 22(6):598-605.
- [17] Yu, M., Wang, Q., Ma, Y., Li, L., Yu, K., Zhang, Z., et al., 2018. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Modulates Intestinal Epithelial Barrier Function by Maintaining Tight Junction Integrity. *Int J Biol Sci* 14(1):69-77.
- [18] Yu, K., Ma, Y., Zhang, Z., Fan, X., Li, T., Li, L., et al., 2018. AhR activation protects intestinal epithelial barrier function through regulation of Par-6. *J Mol Histol* 49(5):449-458.
- [19] Xu, C.X., Wang, C., Zhang, Z.M., Jaeger, C.D., Krager, S.L., Bottum, K.M., et al., 2015. Aryl hydrocarbon receptor deficiency protects mice from diet-induced adiposity and metabolic disorders through increased energy expenditure. *Int J Obes (Lond)* 39(8):1300-1309.
- [20] Moyer, B.J., Rojas, I.Y., Kerley-Hamilton, J.S., Nemani, K.V., Trask, H.W., Ringelberg, C.S., et al., 2017. Obesity and fatty liver are prevented by inhibition of the aryl hydrocarbon receptor in both female and male mice. *Nutr Res* 44:38-50.
- [21] Lee, J.H., Wada, T., Febbraio, M., He, J., Matsubara, T., Lee, M.J., et al., 2010. A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology* 139(2):653-663.
- [22] He, J., Hu, B., Shi, X., Weidert, E.R., Lu, P., Xu, M., et al., 2013. Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitizes mice to nonalcoholic steatohepatitis by deactivating mitochondrial sirtuin deacetylase Sirt3. *Mol Cell Biol* 33(10):2047-2055.
- [23] Wada, T., Sunaga, H., Miyata, K., Shirasaki, H., Uchiyama, Y., Shimba, S., 2016. Aryl Hydrocarbon Receptor Plays Protective Roles against High Fat Diet (HFD)-induced Hepatic Steatosis and the Subsequent Lipotoxicity via Direct Transcriptional Regulation of Socs3 Gene Expression. *J Biol Chem* 291(13):7004-7016.
- [24] Natividad, J.M., Agus, A., Planchais, J., Lamas, B., Jarry, A.C., Martin, R., et al., 2018. Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab* 28(5):737-749 e734.
- [25] Aron-Wisnewsky, J., Prifti, E., Belda, E., Ichou, F., Kayser, B.D., Dao, M.C., et al., 2019. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut* 68(1):70-82.
- [26] Dalmas, E., Rouault, C., Abdennour, M., Rovere, C., Rizkalla, S., Bar-Hen, A., et al., 2011. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr* 94(2):450-458.
- [27] Chantret, I., Rodolose, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., et al., 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* 107 (Pt 1):213-225.
- [28] Morel, E., Ghezzal, S., Lucchi, G., Truntzer, C., Pais de Barros, J.P., Simon-Plas, F., et al., 2018. Cholesterol trafficking and raft-like membrane domain composition mediate scavenger receptor class B type 1-dependent lipid sensing in intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1863(2):199-211.
- [29] Beaslas, O., Cueille, C., Delers, F., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M., et al., 2009. Sensing of dietary lipids by enterocytes: a new role for SR-BI/CLA-1. *PLoS One* 4(1):e4278.
- [30] Petit, C.S., Barreau, F., Besnier, L., Gandille, P., Riveau, B., Chateau, D., et al., 2012. Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 143(1):122-132 e115.
- [31] Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M., Tsukita, S., 2008. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19(11):4687-4693.
- [32] Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., Tsukita, S., 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171(6):939-945.

- [33] Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Inazawa, J., Fujimoto, K., et al., 1997. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol* 73(3):222-231.
- [34] Parks, O.B., Pociask, D.A., Hodzic, Z., Kolls, J.K., Good, M., 2015. Interleukin-22 Signaling in the Regulation of Intestinal Health and Disease. *Front Cell Dev Biol* 3:85.
- [35] Vogel, C.F.A., Haarmann-Stemmann, T., 2017. The aryl hydrocarbon receptor repressor - More than a simple feedback inhibitor of AhR signaling: Clues for its role in inflammation and cancer. *Curr Opin Toxicol* 2:109-119.
- [36] Duan, Y., Zeng, L., Zheng, C., Song, B., Li, F., Kong, X., et al., 2018. Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. *Front Immunol* 9:2649.
- [37] Rothen-Rutishauser, B., Riesen, F.K., Braun, A., Gunthert, M., Wunderli-Allenspach, H., 2002. Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. *J Membr Biol* 188(2):151-162.
- [38] Stadnyk, A.W., 2002. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol* 16(4):241-246.
- [39] Miron, N., Cristea, V., 2012. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin Exp Immunol* 167(3):405-412.
- [40] Garcia, M.A., Nelson, W.J., Chavez, N., 2018. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(4).
- [41] Stein, J., Kottra, G., 1997. [Intestinal intercellular tight junctions. I. Structure and molecular mechanisms of regulation]. *Z Gastroenterol* 35(3):205-220.
- [42] Mitic, L.L., Anderson, J.M., 1998. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 60:121-142.
- [43] Matter, K., Balda, M.S., 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3):225-236.
- [44] Marinelli, L., Martin-Gallaussiaux, C., Bourhis, J.M., Beguet-Crespel, F., Blottiere, H.M., Lapaque, N., 2019. Identification of the novel role of butyrate as AhR ligand in human intestinal epithelial cells. *Sci Rep* 9(1):643.
- [45] Kang, Y., Cai, Y., 2018. The development of probiotics therapy to obesity: a therapy that has gained considerable momentum. *Hormones (Athens)* 17(2):141-151.
- [46] Peters, B.A., Shapiro, J.A., Church, T.R., Miller, G., Trinh-Shevrin, C., Yuen, E., et al., 2018. A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults. *Sci Rep* 8(1):9749.
- [47] Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., et al., 2012. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)* 36(6):817-825.
- [48] Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., 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(9):e7125.
- [49] Andrews, C., McLean, M.H., Durum, S.K., 2018. Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Front Immunol* 9:1270.
- [50] Singh, R., Chandrashekarappa, S., Bodduluri, S.R., Baby, B.V., Hegde, B., Kotla, N.G., et al., 2019. Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway. *Nat Commun* 10(1):89.
- [51] Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., Coumoul, X., 2013. The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov Today* 18(9-10):479-486.
- [52] Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., Coumoul, X., 2018. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open* 7:1-9.
- [53] Dorfel, M.J., Huber, O., 2012. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol* 2012:807356.
- [54] Schuhmacher, D., Sontag, J.M., Sontag, E., 2019. Protein Phosphatase 2A: More Than a Passenger in the Regulation of Epithelial Cell-Cell Junctions. *Front Cell Dev Biol* 7:30.
- [55] Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9(11):799-809.
- [56] Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., 2018. Phosphorylation of tight junction transmembrane proteins: Many sites, much to do. *Tissue Barriers* 6(1):e1382671.

FIGURE LEGENDS**Figure 1: Low expression of AhR target genes in obese subjects with intestinal inflammation.**

(A) CD3⁺ T cell density (cell/mm²) in epithelium/lamina propria ratio (Epi/LP) was determined by immunohistochemistry in jejunum of non obese (n =10) and obese subjects (n = 26). Results are expressed as mean ± SEM, *p< 0.05. (B-F) Pearson correlations of AhR (B), CYP1A1 (C), IL-22 (D), CYP1B1 (E), AhRR (F) mRNA levels in intestinal epithelium and CD3 Epi/LP ratio in female obese subjects. AhR: aryl hydrocarbon receptor, AhRR: aryl hydrocarbon receptor repressor, a.u.: arbitrary units. Pearson r and p value corrected for age and BMI of obese subjects are indicated.

Figure 2: Protective role of AhR activation on cell-cell junctions in murine intestinal epithelium.

Mice were submitted to 5 gavages (5x) with 200µl water or palm oil or palm oil + βNF for five consecutive days. (A) The expression of CYP1A1 and CYP1A2 were determined by RT-PCR in the jejunum. Cyclophilin was used as reference gene. Results are expressed in arbitrary units (a.u.) as the ratio of target gene to cyclophilin (cyclo) mRNA level as mean ± SEM, n=5, ***p< 0.001 as compared to water condition. (B) The distribution of tight junction proteins ZO-1, occludin and tricellulin was analyzed by immunofluorescence on jejunum sections. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Rectangle indicates the field used for an enlargement. White arrowheads indicate the labeling of junction proteins. Scale bar= 20µm. (C) The intestinal permeability was assessed after the last gavage with water, palm oil or palm oil+βNF by measuring plasma concentration of FITC-dextran 4kDa (FD4) one hour after an oral FD4 load. Results are expressed in µg/ml as mean ± SEM, *p<0.05, **p<0.01 as compared to water. Data show one experiment representative of two independent experiments performed with 4-5 mice in each group.

Figure 3: Protective role of AhR activation on EGTA-induced damages of barrier integrity in Caco-2/TC7 cells.

(A) Caco-2/TC7 cells were pre-incubated without (Ctrl) or with 20µM βNF for 4 consecutive days before the addition or 4.5 mM EGTA for additional 24h. βNF treatment was maintained during all the experiment. The expression of CYP1A1 was quantified by RT-qPCR. Cyclophilin was used as reference gene. Results are expressed in arbitrary units (a.u.) as the ratio of target gene to cyclophilin (cyclo) mRNA level as mean ± SEM, n=6-15 from 3 independent experiments, ****p < 0.0001 as compared to control. (B) Cells were cultured in the same conditions as in (A). Paracellular permeability across Caco-2/TC7 cell monolayer was evaluated by measuring the accumulation during 4 h of FITC-4kDa dextran (FD4) in the basal compartment. Results are expressed as percentage of FD4 input (amount added in the apical compartment), mean ± SEM, n=6-15 from 3 independent experiments, ***p<0.001 and ****p<0.0001 as compared to control. (C) Cells were cultured in the same conditions as in (A). TEER was assessed in control and treated cells. Results are expressed in ohm.cm² as mean ± SEM, n=6-15 from 3 independent experiments, **p<0.01 and ***p<0.001 as

compared to control. #### $p < 0.001$ as compared to EGTA. (D) Cells were cultured in the same conditions as in (A). Immunofluorescence analysis was performed to study the location of ZO-1, occludin and tricellulin. Nuclei were stained DAPI, scale bar=20 μ m (E) Cells were cultured as in (A). Occludin and tricellulin protein levels were determined in cell lysates using a capillary-based western blot. Reconstituted images were displayed. Hsc70 protein levels were used as loading control. (F) Caco-2/TC7 cells were first incubated in presence or not of 4.5mM EGTA for 4h. Medium were then removed and replaced by fresh medium in presence or not of 20 μ M β NF for 20h. TEER was measured before EGTA treatment (T0), after 4h of EGTA treatment (T4) and at different times after β NF addition. Results are expressed in percentage of TEER measured at T0 for each cell culture condition as mean \pm SEM, n=6 from 2 independent experiments. * $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$ as compared to control and ## $p < 0.01$ as compared to EGTA.

Figure 4: AhR activation prevents the increase of cytokine expression induced by EGTA.

Caco-2/TC7 cells were cultured in the same conditions as in Figure 3. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-8 (C), were quantified by RT-PCR. Cyclophilin was used as reference gene. Results are expressed in arbitrary units (a.u.) as the ratio of target gene to cyclophilin (cyclo) mRNA level as mean \pm SEM, n=20-30. (D) The concentration of IL-8 protein in the basal compartment was quantified by ELISA 24h after EGTA treatment. Results are expressed in pg/ml as mean \pm SEM, n=6. Fold-increase as compared to control condition is indicated at the top of bar plots. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ as compared to control unless otherwise indicated. Figure 4A and 4B represent compiled data for 6 independent experiments, each experiment consisted of 3-6 independent transwells; Figure 4C represents compiled data for 2 independent experiments in triplicate.

Figure 5: Signaling pathways are involved in the preventive effect of AhR activation on transepithelial resistance.

Caco-2/TC7 cells were pre-incubated with (A) 5 μ M of protein kinase C inhibitor Ro 31-8220 (Ro) or (B) 20 μ M of p38MAPK inhibitor SB203580 (SB) or (C) 10 μ M of protein kinase ERK1/2 inhibitor U0126, 1-hour prior β NF addition. These treatments were repeated daily for 4 days. EGTA was added for the last 4 hours of treatment. Transepithelial resistance (TEER) was measured at the end of the experiment. Results are expressed in percentage of TEER value measured in control condition at the end of experiment, as mean \pm SEM, n=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ as compared to control unless otherwise indicated. Data are representative of 2 independent experiments performed in triplicate. (D) Lactate dehydrogenase (LDH) was quantified in the apical medium and results are expressed as percentage of LDH activity measured in a total cell lysate (mean \pm SEM), n=6.

Figure 6: Protective role of AhR on intestinal barrier and cytokine expression.

A) Obese non-diabetic subjects can be classified according to their small intestinal inflammation score established by the densities of T lymphocytes using the CD3 marker. The epithelium/lamina propria (Epi/Lp) CD3 ratio quantifies T lymphocytes infiltration within epithelium in jejunum samples. Obese subject with high CD3 Epi/Lp ratio display lower AhR activity. **B)** In intestinal epithelial cells, lipid load or treatment with calcium chelator (EGTA) damages barrier integrity (increase in paracellular permeability and alteration of tight junctions) and induces the expression and the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8. In human intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line, the activation of AhR by an agonist increases the expression of occludin (occ) and tricellulin (tric) and improves their localization at tight junctions (TJ), restores paracellular permeability to ions and prevents the IL-8 expression and secretion induced by barrier disruptor agent through mechanisms involving protein kinases C and p38MAPK.

Table 1. Clinical and biological baseline characteristics of non- obese and obese patients enrolled in the study

	non-obese (n= 10)	obese (n= 26)	pvalue obese vs non- obese
Demographic data			
sex ratio M/F, %	100 / 0	4 / 96	< 0.0001
age (years)	58.8 ± 4.9 (42-84)	39.3 ± 2.3 (21-64)	0.0002
Corpulence and adiposity			
weight (kg), mean ± SEM (min-max)	69.5 ± 3.2 (50-87)	124.3 ± 4.7 (83.1-184.4)	< 0.0001
BMI (kg/m ²), mean ± SEM (min-max)	22.6 ± 0.82 (16.9-26.37)	46.5 ± 1.3 (38.1-56.9)	< 0.0001
Comorbidities			
type 2 diabetes, %	0	0	-
dyslipidemia, %	16	90	0.0164
hypertension, %	0	25	0.1310
Glucose metabolism			
glycemia (mmol/L), mean ± SEM (min-max)	-	5.3 ± 0.1 (4.3-6.4)	-
insulinemia (mU/L), mean ± SEM (min-max)	-	25.1 ± 3.9 (9.5-67.5)	-
HOMA-IR index, mean ± SEM (min-max)	-	6.3 ± 1.1 (2.4-18.7)	-
Lipid metabolism			
total cholesterol (mmol/L), mean ± SEM (min-max)	-	5.0 ± 0.2 (3.3-7.2)	-
triglycerides (mmol/L), mean ± SEM (min-max)	-	1.3 ± 0.08 (0.47-1.96)	-
HDL (mmol/L), mean ± SEM (min-max)	-	1.1 ± 0.06 (0.7-1.6)	-
LDL (mmol/L), mean ± SEM (min-max)	-	3.3 ± 0.2 (1.9-5.2)	-

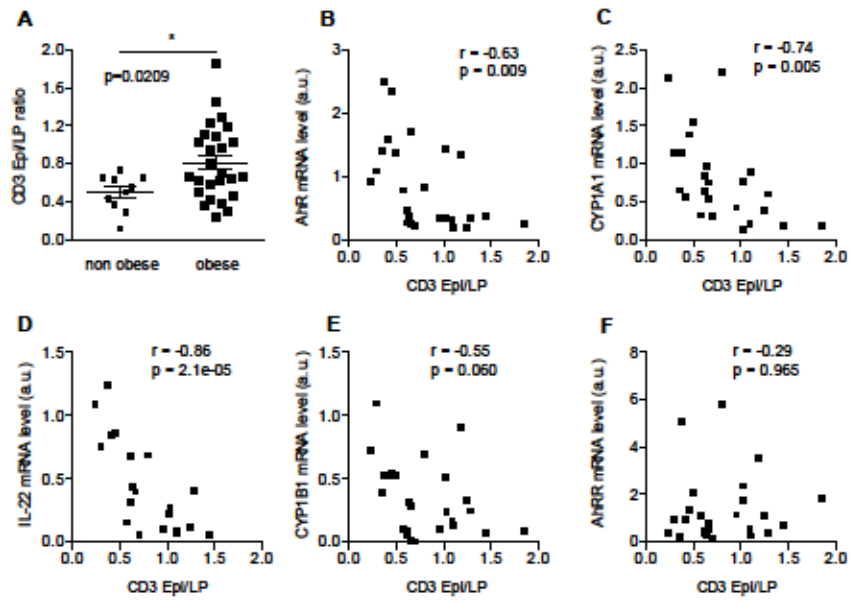


Figure 1

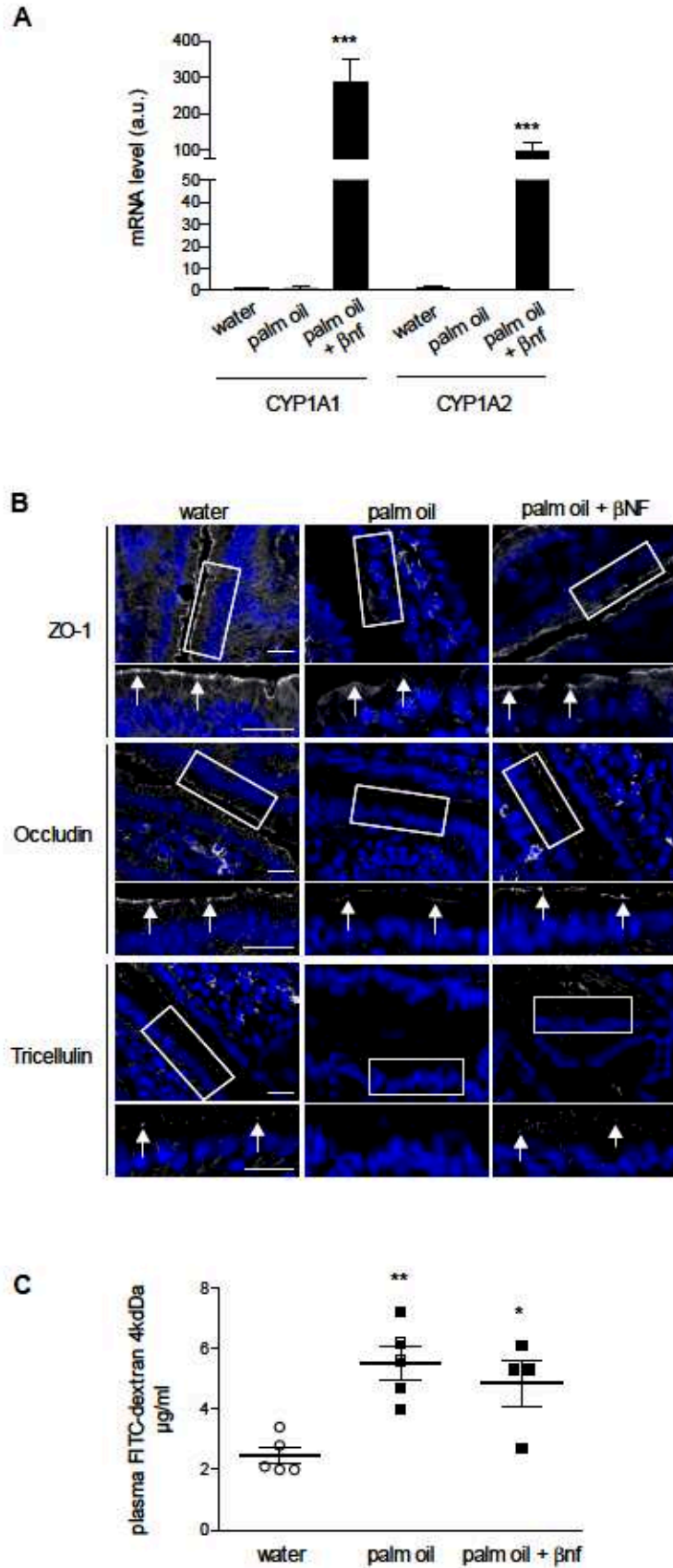


Figure 2

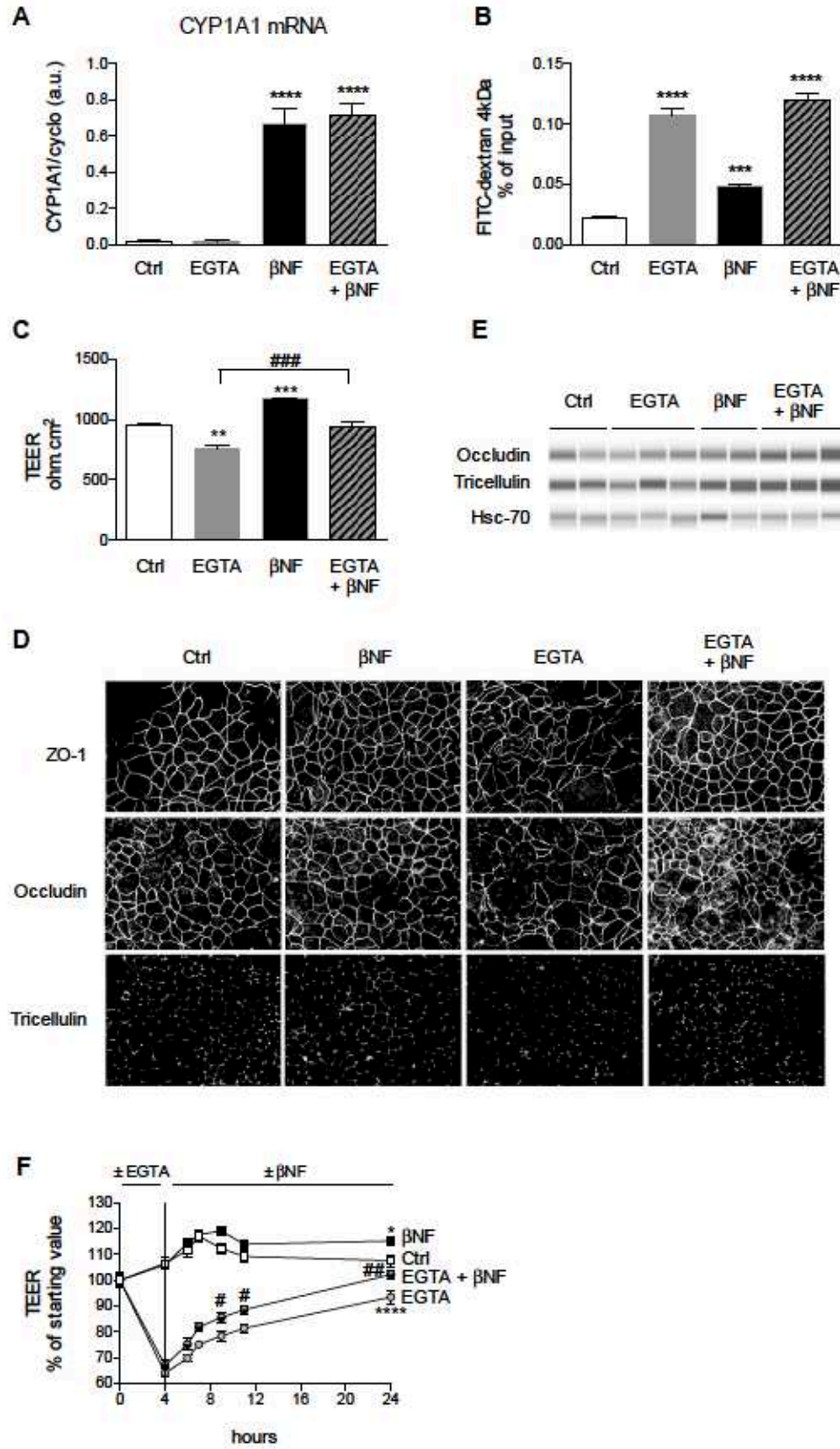


Figure 3

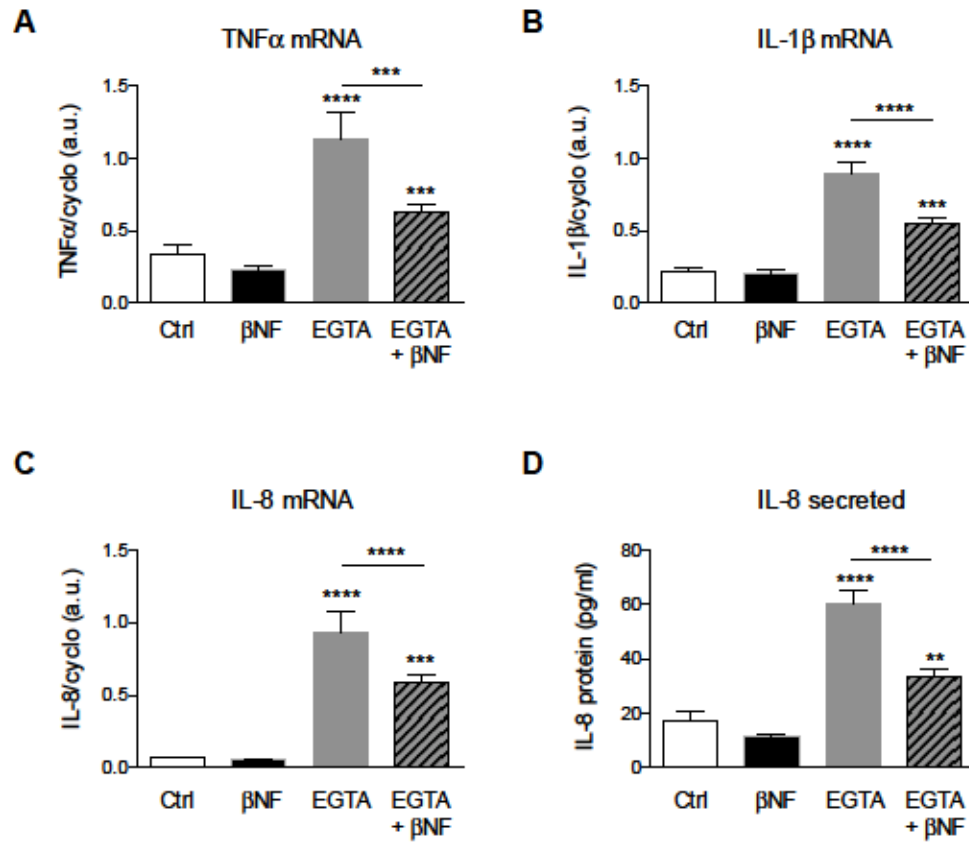


Figure 4

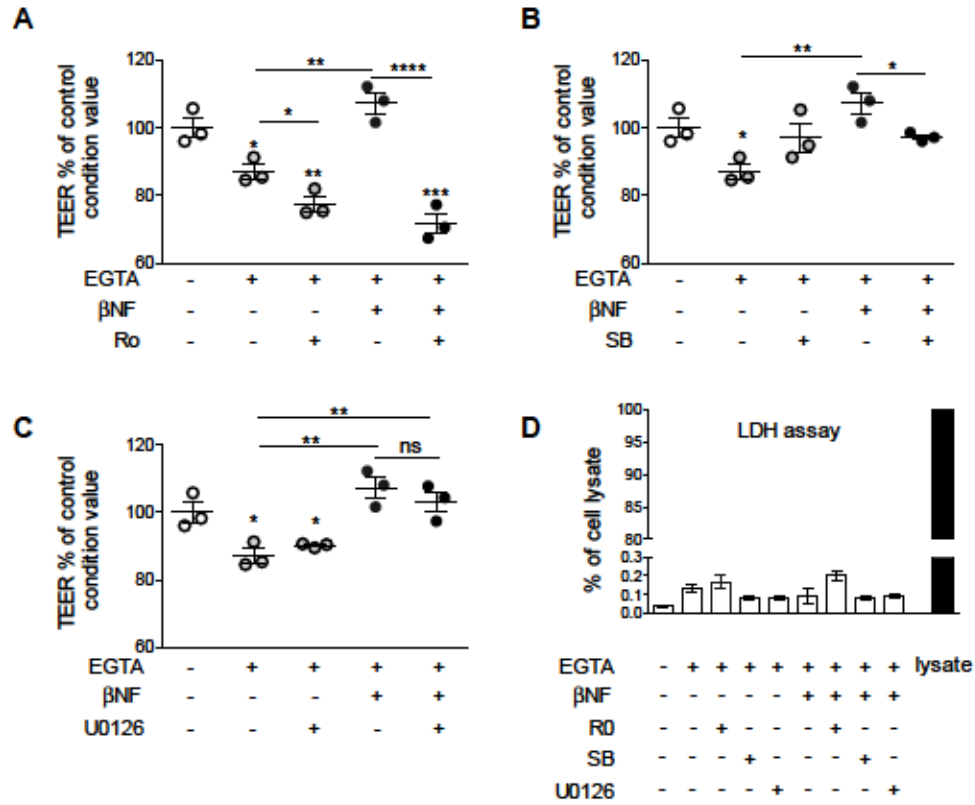
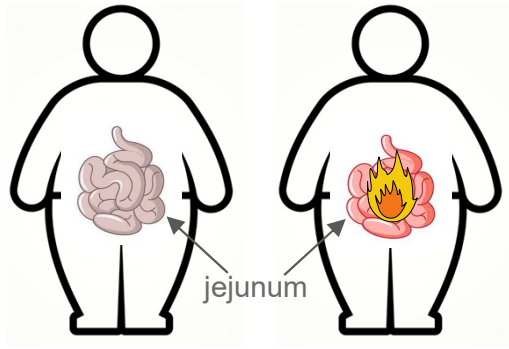


Figure 5

A

Obese subjects



low CD3 Epi/Lp
normal AhR activity

high CD3 Epi/Lp
low AhR activity

B

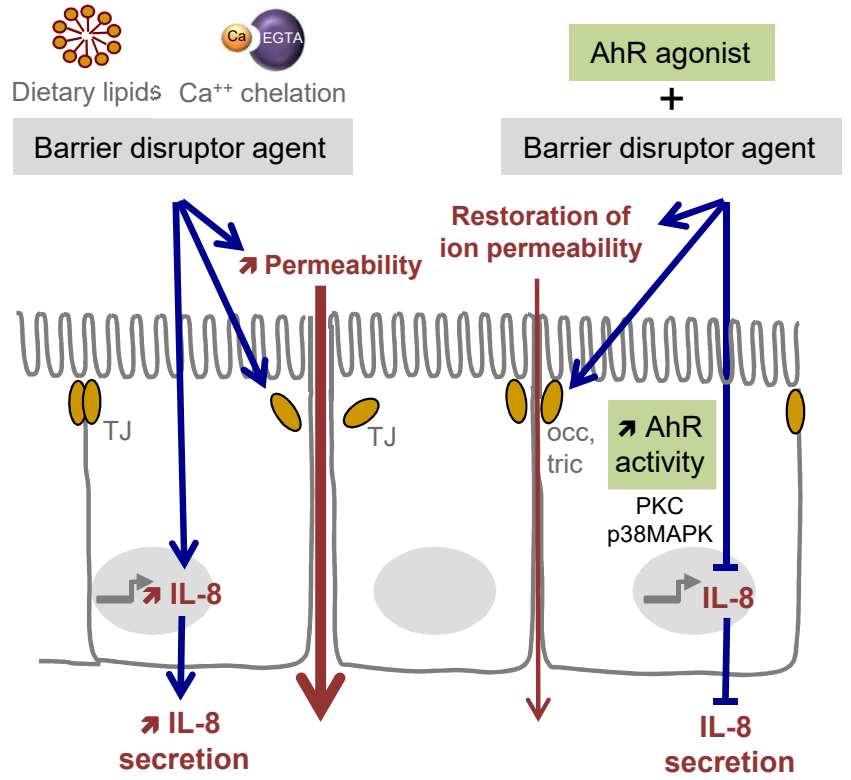


Figure 6

Postal et al “AhR activation defends gut barrier integrity against damage occurring in obesity”

HIGHLIGHTS

- Intestinal inflammation in obese subjects correlates with low AhR activity
- AhR activation protects intestinal epithelium from damages
- AhR activation prevents cytokine induction in response to damages
- Protective role of AhR activation targets junctional complexes
- Protein kinases-dependent signaling pathways are involved in AhR action

Postal et al “AhR activation defends gut barrier integrity against damage occurring in obesity”

Conflict of interest

No conflict of interest declared.

Journal Pre-proof

