



HAL
open science

Réseaux sociaux dans l'intestin : les Acyl-Homosérine Lactones, molécules du Quorum Sensing, modulent l'inflammation intestinale

Garance Coquant

► To cite this version:

Garance Coquant. Réseaux sociaux dans l'intestin : les Acyl-Homosérine Lactones, molécules du Quorum Sensing, modulent l'inflammation intestinale. Microbiologie et Parasitologie. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS324 . tel-03682526

HAL Id: tel-03682526

<https://theses.hal.science/tel-03682526v1>

Submitted on 31 May 2022

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 Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Centre de Recherche Saint-Antoine
Equipe Philippe Seksik et Harry Sokol
« Microbiote, Intestin Inflammation »

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Réseaux sociaux dans l'intestin : les Acyl-Homosérine Lactones, molécules du Quorum Sensing, modulent l'inflammation intestinale

Présentée par **Garance Coquant**

Dirigée par le Professeur **Philippe Seksik**

Présentée et soutenue publiquement le 10 décembre 2021
Devant un jury composé de :

Professeur Joëlle-Sobczak-Thépot
Docteur Corinne Granette
Docteur Nicolas Lapaque
Docteur Emilie Viennois
Docteur Raphaël Lami
Professeur Philippe Seksik

Présidente du jury
Rapportrice
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Directeur de thèse

A mon grand-père, qui m'a tant donné et qui m'a tant transmis. Tu me manques.

« On risque de pleurer un peu si l'on s'est laissé apprivoisé »

LE PETIT PRINCE, ANTOINE DE SAINT-EXUPERY

« – Les gens ont des étoiles qui ne sont pas les mêmes. Pour les uns, qui voyagent, les étoiles sont des guides. Pour d'autres elles ne sont rien que de petites lumières. Pour d'autres, qui sont savants, elles sont des problèmes. Pour mon businessman elles étaient de l'or. Mais toutes ces étoiles-là se taisent. Toi, tu auras des étoiles comme personne n'en a...

– Que veux-tu dire ?

– Quand tu regarderas le ciel, la nuit, puisque j'habiterai dans l'une d'elles, puisque je rirai dans l'une d'elles, alors ce sera pour toi comme si riaient toutes les étoiles. Tu auras, toi, des étoiles qui savent rire !

Et il rit encore.

– Et quand tu seras consolé (on se console toujours) tu seras content de m'avoir connu. Tu seras toujours mon ami. Tu auras envie de rire avec moi. Et tu ouvriras parfois ta fenêtre, comme ça, pour le plaisir... »

LE PETIT PRINCE, ANTOINE DE SAINT-EXUPERY

ABSTRACT

N-Acyl-Homoserine Lactones (AHLs) are Quorum Sensing molecules involved in bacterial network communication and are also able to have effects on eukaryotic cells as part of the inter-kingdom signalling. Our team identified AHLs in the gut ecosystem, and among them one that had never been described, 3-oxo-C12:2-HSL. The molecule was decreased in Inflammatory Bowel Disease (IBD) patients and its presence was correlated to normobiosis. 3-oxo-C12:2-HSL is structurally close to 3-oxo-C12-HSL, a well characterised molecule produced by the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Following its identification, several goals have been set to study 3-oxo-C12:2-HSL: (i) explore its effects on the intestinal barrier function; (ii) study its impact on inflammation; (iii) synthesize analogue molecules with greater effects aiming at developing new therapeutics. The latter brought us to synthesize 3-oxo-C12-2-Amino-4-ChloroPhenol (ACP), a molecule which has strong anti-inflammatory properties. The aim of my PhD was to study the effects of the natural molecule 3-oxo-C12:2-HSL and ACP, a synthetic analogue, on intestinal inflammation as well as involved mechanisms and prospective eukaryotic receptors.

We used the murine macrophages RAW264.7 cell line as well as peripheral blood mononuclear cells (PBMC) activated with interferon- γ and lipopolysaccharide. Immune cells exposed to 3-oxo-C12:2-HSL or ACP (50 μ M) secreted less pro-inflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor- α and interleukin 1 β compared to control cells. Moreover, by analysing the transcriptome of RAW264.7 cell exposed to either one of the AHLs, we identified specifically one inflammatory pathway differentially down-regulated compared to the control: JAK-STAT pathways. Phosphorylation of the transcriptional factor RelA from the NF- κ B pathway was decreased in presence of 3-oxo-C12:2-HSL. In addition, this AHL down-regulated specifically the phosphorylation of JAK1 and STAT1. Besides, we hypothesised that, due to their analogous structure, 3-oxo-C12-HSL and 3-oxo-C12:2-HSL shared the same cellular partner, notably among the G-protein coupled receptors, the bitter taste receptor T2R38, expressed by immune cells and intestinal epithelial cells. The immunomodulatory effects of 3-oxo-C12:2-HSL were abolished in presence of an allosteric inhibitor of T2R38. We also identified by screening seven other bitter taste receptors by 3-oxo-C12:2-HSL but not ACP.

To conclude, AHLs are new actors in host-microbiota interactions and their study is a new lead in the IBD physiopathology. Developing mechanisms involved and their effects *in vivo* is a requirement to clarify those inter-kingdom interactions.

Key words:

Inflammation; Inflammatory Bowel Disease; Quorum Sensing; *N*-Acyl Homoserine Lactone ; Bitter Taste Receptors

RESUME

Les *N*-Acyl-Homoserine Lactones (AHLs) sont des molécules du Quorum Sensing impliquées dans le réseau de communication inter-bactérien et peuvent également être reconnues par les cellules eucaryotes dans le cadre du dialogue inter-règne. Notre équipe a récemment mis en évidence la présence de différentes AHLs dans l'écosystème intestinal humain et identifié une AHL jusqu'alors jamais décrite, la 3-oxo-C12:2-HSL. La présence de cette molécule était diminuée chez les patients atteints de Maladie Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), cette diminution étant corrélée à un état de dysbiose. La 3-oxo-C12:2-HSL est structurellement proche de la 3-oxo-C12-HSL, molécule bien caractérisée et produite par la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa*. Suite à la mise en évidence de la 3-oxo-C12:2-HSL, plusieurs objectifs ont été définis : (i) explorer les effets de cette molécule sur la fonction de barrière intestinale ; (ii) étudier les effets sur l'inflammation ; (iii) synthétiser des analogues ayant des effets plus forts, à visée thérapeutique. C'est dans le cadre de ce troisième axe qu'a été synthétisé la 3-oxo-C12-2-Amino-4-ChloroPhénol (ACP), molécule ayant des fortes propriétés anti-inflammatoires. Les objectifs de ma thèse ont été d'étudier l'impact de la molécule naturelle 3-oxo-C12:2-HSL et d'un analogue synthétique ACP sur l'inflammation intestinale, les mécanismes impliqués et d'identifier de potentiels récepteurs.

Nous avons utilisé la lignée de macrophage murins RAW264.7 ainsi que des cellules mononucléées issues du sang périphérique stimulés par de l'interféron- γ et du lipopolysaccharide. Les cellules immunitaires exposées à la 3-oxo-C12:2-HSL ou à l'ACP à 50 μ M sécrétaient moins de cytokines pro-inflammatoires dont le Tumor Necrosis Factor- α et l'interleukine-1 β par rapport aux contrôles. De plus, en analysant le transcriptome des cellules RAW264.7 exposés à l'une ou l'autre des AHLs, nous avons identifié spécifiquement une voie de l'inflammation différenciellement régulée à la baisse par rapport à la condition contrôle : la voie JAK-STAT. Cette AHL diminuait spécifiquement la phosphorylation des protéines JAK1 et STAT1. Par ailleurs, nous avons émis l'hypothèse que, du fait de leur structure proche, la 3-oxo-C12-HSL et la 3-oxo-C12:2-HSL partageaient les mêmes cibles cellulaires eucaryotes, notamment parmi les récepteurs couplés à une protéine G, le récepteur du goût amer T2R138, exprimé par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales intestinales. Les effets modulo-inflammatoires de la 3-oxo-C12:2-HSL étaient abolis en présence d'un inhibiteur allostérique de T2R138. Nous avons également identifié par *screening* sept autres récepteurs du goût amer activés par la 3-oxo-C12:2-HSL et non pas par l'ACP.

En conclusion, les AHLs sont des nouveaux acteurs de l'interaction hôte microbiote et leur étude constitue une nouvelle piste dans la physiopathologie des MICI. L'étude des mécanismes impliqués et leurs effets *in vivo* demeure nécessaire pour mieux comprendre ces interactions inter-règne.

Mots Clés :

Inflammation ; Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin ; Quorum Sensing ; *N*-Acyl Homosérine Lactones ; Récepteurs du Goût Amer

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à Corinne Grangette et à Nicolas Lapaque en tant que rapporteurs, ainsi qu'aux examinateurs Emilie Viennois et Raphaël Lami. Je remercie également Joëlle Sobczak-Thepot de présider mon jury de thèse.

Je remercie la Fondation pour la Recherche Médicale d'avoir financé ma thèse durant trois ans. Je suis aussi reconnaissante à l'Université et à l'école publique de m'avoir permis de faire des études.

Avant de remercier chacun individuellement, j'aimerais remercier toute notre équipe. Je me suis toujours sentie épaulée et aidée, dans les manip réussies comme dans les galères. Merci de m'avoir donné envie de venir tous les jours au laboratoire, de me permettre de rire et de passer des bons moments même quand c'était difficile, à travers les larmes de joies et de peines dans tous nos moments conviviaux (qui se sont fait de plus en plus rares malgré nous) et à tous ces gâteaux qui n'étaient jamais loin.

Philippe, je te remercie infiniment. Tu m'as donnée une opportunité il y a cinq ans et je t'en suis reconnaissante. Grâce à toi, j'ai découvert le monde du microbiote, des AHLs (heureusement qu'on y croyait un peu quand même dans ce projet). Tu m'as permise d'apprendre énormément, aux côtés de personnes formidables et incroyables, dès le début de mon master. J'ai aimé mon sujet de thèse, même quand rien ne fonctionnait. Je me suis sentie écoutée, soutenue et guidée dans toutes les étapes de cette thèse. Merci pour ta confiance et ta patience, tu as toujours su te rendre disponible quand j'avais besoin de toi. Merci pour ton humanité et ta gentillesse, ton optimisme sans faille.

Sophie, je te remercie pour m'avoir accueilli il y a cinq ans en stage alors que je n'étais qu'un bébé au labo et d'avoir continué à me guider depuis. Merci pour ton aide, tes conseils si justes, et surtout ta bonté et ta présence. Un merci infini pour ta relecture et ton aide dans la rédaction de cette thèse. Merci à toi et Jérôme pour toutes les colos au château Plaisir-Grignon, au rhum citron, au earl grey, à la wax et au rougail morue.

Doriane, je te dois beaucoup sur mes connaissances scientifiques et techniques mais aussi bien au-delà. A tout ce que l'on a partagé : les manips, les ginger-tea, les paillettes, les chats, les fou-rires, les frites... ; et à ce que tu m'as transmis : la rigueur scientifique, le yoga, mille recettes... Et mille autres choses (non, il n'y a pas d'eau dans mes yeux). Merci pour ta patience quand je n'étais alors que stagiaire, pour tous tes conseils et ton aide. Ça a été un plaisir de continuer à travailler à tes cotés par la suite. Tu es une personne solaire, généreuse et empathique. Les allemands ont bien trop de chance. Même de loin, j'espère pouvoir continuer à échanger et partager avec toi.

REMERCIEMENTS

Véro, merci pour tous tes conseils si justes et pertinents sur tout, ta patience et ton aide avec les souris. Je te remercie de m'avoir accueillie à mi-parcours comme voisine de bureau.

Marielle, merci pour tous ces moments aquatiques mais aussi à la paillasse (merci pour tes précieux conseils en WES) et au-delà. Tu es vraiment une atypique, toujours dynamique et prête à me suivre dans mes bêtises, tu es une vraie perle rare. Je n'oublierai pas la tarte tatin.

Loïc, merci pour ton aide technique, ta disponibilité, ton travail consciencieux et ta rigueur.

Sandrine, je te remercie pour ton aide sur l'histo et tous les marquages et tes conseils en général

Merci à Jean-Pierre et Luisa pour vos conseils.

Merci à Nathalie, pour ta gourmandise (les macarons, les glaces, le chocolat et plus encore) et tes milles conseils, Merci à Sothéa pour ton aide avec les PBMC, les souris et les adorables photos d'Alice, Merci à Thibaud, Marjojo, Cyriane, Chloé, Sarah, Sylvie, Margaux, Lorenzo (et ton estomac digne du sac de Marie Poppins), Valérica, Lydie (pour tous tes conseils et ton aide en spectrométrie de masse), Morgane.

σας ευχαριστώ Ilias pour ces bons moments au labo.

Thank you Aonghus for your help on bioinformatics even though I must have been the worst student ever.

Merci Agathe, pour tous tes conseils de chimistes et les moments passés à la paillasse.

Je remercie le personnel de l'animalerie, en particulier Tatiana, Tim et Vanessa. Je remercie aussi les équipes de chocs qui m'ont permises de faire ces expériences animales en toute sérénité : Véro, Sophie, Sandrine, Alexandra, Doriane, Sandrine, Julie et Thibaud.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe à Banyuls, où j'ai pu apprendre et faire les expériences de spectrométrie de masse. Merci en particulier à Alice Rodrigues pour ta gentillesse et ton dynamisme, mais aussi à Raphaël Lami pour tes précieux conseils. Je suis ravie que tu fasses partie de mon jury.

Je remercie nos collaborateurs à Dijon, Christine Belloir et Loïc Briand pour votre travail sur ce projet ainsi que de vos conseils.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse, Julie Leloup et Hervé Blottière, grâce à qui nous avons pu collaborer avec l'équipe de l'INRAE de Dijon.

Merci aux stagiaires qui ont travaillé avec moi, Julie, Nathalie et Thibaud, pour leur aide à la paillasse.

Merci aux filles des soirées Caïpi et aux multiples week-ends à la neige ou à la mer, pour toutes ces soirées de détente et de rire, que ce soit au bar avec des FRITES ou sur Skype pendant

REMERCIEMENTS

les confinements, aux brunchs avec du houmous, du pain au sarrasin, aux amandes caramélisées au sésame, aux PETITS CANETONS, à toutes ces petites choses, à tous ces petits bonheurs qui font que quand même, ces années étaient incroyables. Merci à vous Doriane, Barbara, Céline, Marjojo, Ingrid et Atoussa. Obrigada especial por viaja ao Brasil Barbara, Doriane e Céline (e Mariana !) e coatcccchi, foi fantástico !

Merci Paul pour ce début de thèse sur les chapeaux de roues, pour ces gouters-thés partagés et ces moments de joie.

Je remercie toutes les personnes que j'ai peut-être oublié en écrivant ces lignes, mais qui m'ont aidé à aboutir ce projet.

Merci à mon microbiote qui ne m'a jamais laissée seule.

Merci à Kiitos, qui ne sait pas lire mais ronronne très bien et qui est toute petite toute mignonne (en chat : vroom brooooo broooo miaou).

Pas merci au Coronavirus, qui s'est frayé un chemin dans ma thèse, qui a fait que certains moments étaient beaucoup moins drôles. On a frôlé la pénurie de plastique, de cônes, de motivation.

Travail, rigueur, abnégation comme disait M. Fugit, mon professeur de chimie en licence. La thèse c'est beaucoup de travail, une rigueur indispensable et parfois de l'abnégation. Mais ce sont aussi des moments humains où, quand on est démoralisés, il y a la petite étincelle qui revient, les petites étoiles sur les graphs qui donnent des étoiles dans les yeux. C'est un soulagement d'avoir fini ce marathon, mais c'est difficile aussi. C'est la fin d'une aventure, le début d'une autre. Il est temps de partir, de changer d'équipe, de pays et de quitter les AHLs. C'est un peu difficile de quitter ce petit nid. Il y a tant de personnes à remercier, qu'il est possible que j'en oublie. Pendant toute cette thèse, j'ai été entourée de bienveillance, j'étais là pour apprendre et j'ai appris j'ai grandi. Merci à tous.

Un immense merci à tous mes amis, pour ces moments d'évasions, en week-end ou en vacances. Léna, Marine et Marie-Camille, vous m'avez permis de réaliser que les arbres ne sont pas faits pour moi. Merci aux copains du sud pour les semaines de détente autour de la piscine.

Célia, on se connaît depuis si longtemps maintenant, tu es une sœur pour moi. Merci pour absolument tout et merci d'être toujours là. Tu apportes tellement à ma vie et je suis chanceuse de te connaître.

Merci à ma famille pour leur amour inconditionnel ; ma mère, Axel, Raphaël, Rose, ma grand-mère et André, grâce à vous j'ai pu bien étudier mes petites bêtes. Mon grand-père, ma grand-mère sans qui je n'aurais jamais eu la chance de faire toutes les études que j'ai faites, je leur dois une reconnaissance éternelle. Merci à mon grand-père, qui m'a transmis le goût de la science, de la remise en question permanente, de la logique et du rationnel mais aussi du goût du bon mot et de la générosité. Tu es parmi les étoiles, la plus brillante quand je regarde le ciel.

REMERCIEMENTS

Merci à Christine, Gérard, Sylvain et Mandye pour leur accueil chaleureux dans la famille et ces bons moments en Ardèche.

Léo, merci de ton soutien, tous les jours, de près comme trop souvent de loin. La vie est plus douce et plus drôle depuis que tu es là. Tu es arrivé au milieu de cette o'dyssée, heureusement que les *T. rex* ont existé. Tu m'as supportée et soutenue pendant le(s) confinement(s), tu as été patient, tu m'as réconfortée contre mes doutes, mes angoisses, mes peines, mais tu as toujours su trouver les mots et m'encourager. Et surtout, à tous ces moments où nous avons ri. Here comes the o'future !

SOMMAIRE

Liste des abréviations	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Préface	ix
Introduction	1
I- L'intestin, organe complexe à l'interface de deux compartiments	2
A. Organisation générale de l'intestin	2
1. <u>Structure macroscopique de l'intestin</u>	2
2. <u>Structure tissulaire et cellulaire de l'épithélium intestinal</u>	3
3. <u>Fonctions de l'intestin</u>	4
B. La muqueuse intestinale et son système immunitaire	6
1. <u>La barrière intestinale</u>	6
i. Barrière écologique	6
ii. Barrière chimique	6
iii. Barrière physique	7
2. <u>Le système immunitaire intestinal</u>	10
i. Système immunitaire inné de l'intestin	10
ii. Système immunitaire adaptatif de l'intestin	16
C. Le microbiote, élément clé dans l'intestin	18
1. <u>Composition</u>	18
2. <u>Importance des fonctions du microbiote dans la physiologie</u>	21
II- Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin	26
A. Physiopathologie des MICI	26
1. <u>Considérations générales</u>	26
2. <u>Facteurs génétiques</u>	28
3. <u>Facteurs environnementaux</u>	29
B. Perturbation chez l'hôte lors des MICI	31
1. <u>Réponse inflammatoire exacerbée</u>	31
2. <u>Altération de la barrière intestinale</u>	36
i. Altération de la couche de mucus	36
ii. Altération de la barrière chimique	37
iii. Altération des jonctions inter-cellulaires	37
C. La dysbiose dans les MICI	39
1. <u>Définition</u>	39
2. <u>Dysbiose compositionnelle</u>	39

3. <u>Dysbiose fonctionnelle</u>	41
III- Le Quorum Sensing	46
A. Quorum Sensing : le réseau social des bactéries	46
1. <u>Mécanisme général du Quorum Sensing</u>	46
i. Découverte du Quorum Sensing chez <i>Vibrio fisheri</i>	46
ii. Auto-inducteurs et bactéries	47
2. <u>Les différents QS</u>	49
i. Bactéries à Gram négatif et Quorum Sensing	49
ii. Bactéries à Gram positif et Quorum Sensing	53
iii. AI-2 : Quorum Sensing universel	53
3. <u>Quorum Quenching</u>	54
B. Effets inter-règnes des AHLs : dialogue entre l'hôte et son microbiote	56
1. <u>Effets des AHLs sur les cellules épithéliales et la barrière intestinale</u>	56
2. <u>Effets des AHLs sur l'immunité innée</u>	58
i. Les cellules dendritiques	58
ii. Les neutrophiles	58
iii. Les macrophages	59
3. <u>Effets des AHLs sur l'immunité adaptative</u>	63
4. <u>Cibles eucaryotes des AHLs</u>	65
i. Absence de récepteur défini	65
ii. PPAR γ	65
iii. IQGAP1	66
iv. AhR	66
v. T2R138	66
5. <u>Réponse des cellules de l'hôte au Quorum Sensing</u>	68
i. Les Paraoxonases	68
ii. Molécules de communication de l'hôte et Quorum Sensing	69
B. Le Quorum Sensing dans l'intestin	70
1. <u>Connaissances actuelles</u>	70
2. <u>Identification de la 3-oxo-C12:2-HSL dans l'écosystème intestinal humain</u>	71
3. <u>Modulations chimiques d'AHLs ayant des effets optimisés</u>	74
Objectifs	75
Résultats	77
I- Effets de la 3-oxo-C12:2-HSL, molécule naturelle, sur l'homéostasie intestinale 78	
A. La 3-oxo-C12:2-HSL, molécule du Quorum Sensing du microbiote intestinal humain, inhibe l'inflammation dans les cellules immunitaires via les récepteurs du gout amer (Article principal)	78

B. Effets des AHLs sur la fonction de barrière intestinale : La 3-oxo-C12 :2-HSL, Acyl-Homosérine Lactone du Quorum Sensing intestinal, diminue la perturbation des jonctions serrées induite par les cytokines	107
C. Résultats complémentaires	128
1. <u>Effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur un panel de cytokines</u>	128
2. <u>Effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur la composition du microbiote à l'état basal</u>	
i. Les AHLs atteignent-elles le côlon ?	129
ii. Les AHLs modifient-elles la composition du microbiote à l'état basal ?	130
II- Impact de l'ACP, molécule synthétique, sur l'homéostasie intestinale	134
A. Effets in vitro de l'ACP	134
B. Effets in vivo dans un modèle de colite inflammatoire chez la souris	138
1. <u>Mise au point des conditions expérimentales</u>	138
2. <u>Effets des AHLs dans un modèle de colite inflammatoire</u>	139
Discussion et Perspectives	145
I- Les AHLs, point de vue original dans le paradigme du Quorum Sensing	146
II- Récepteurs et mécanismes d'action inter-règne des AHLs	150
III- Dialogues sociaux dans l'intestin : conversation entre le microbiote et l'hôte	154
Conclusion générale	159
Références bibliographiques	161
Annexes	181
Liste des communications scientifiques	
Article annexe en deuxième auteur : Peyrottes <i>et al</i> , 2020	
Revue en deuxième auteur :	
-	Coquant, Mc Lellan et Seksik, 2019
-	Coquant, Grill et Seksik, 2020
-	Coquant, Aguanno <i>et al</i> , 2021

LISTE DES ABBREVIATIONS

3-oxo-C12:2-HSL

3-oxo-C12-HSL : N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone

ACP : 3-oxo-C12-2-Amino-4-ChloroPhénol

AGCC : acides gras à chaîne courtes

AHL : N-Acyl-Homoserine Lactone

AhR : aryl d'hydrocarbure

AI : auto-inductrice

AIEC : *E.coli* adhérent-invasifs

BTR : Récepteur du goût amer (*bitter taste receptor*)

C4-HSL : N-butanoyl-L-homoserine lactone

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène

CSF-1 : *Colony-Stimulating Factor-1*

DAMPs : *Damage-associated molecular patterns*

DC : cellules dendritiques

DSS : Dextran Sulfate Sodium

FD4 : FITC-4kDa

GABA : acide γ -amino butyrique

GALT : *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

GIP : Gastric Inhibitory Polypeptide

GLP1 : Glucagon-Like Peptide 1

HMP : *Human Microbiome Project*

IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN γ : interféron- γ

IFN γ : Interféron- γ

IgA : Immunoglobuline A

IL-2 : Interleukine-2

ILCs : cellules lymphoïdes innées

IP₃ : inositol triphosphate

IQGAP1 : IQ-motif containing GTPase-Activating Protein

IQS : *Integrated Quorum Sensing*

IRE1 : *Inositol-Requiring Enzyme 1*

LC-MS/MS : chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse

LPS : lipopolysaccharide

LT lymphocytes T

MAM : *microbial anti-inflammatory molecule*

MAMPs : MAMPs (*Microbial-Associated Molecular Patterns*)

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MC : Maladie de Crohn

MDP : Muramyl di-peptide

LISTE DES ABBREVIATIONS

MetaHIT : *Metagenomics of Human Intestinal Tract*
MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MLCK : Myosin light chain kinase
MMP-2: métalloprotéinases matricielles MMP-2
NF- κ B : Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK : *Natural Killer*
NLR : NOD-Like Receptor
NOD2 : Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2
PAMPs : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
PAMs : peptides anti-microbiens
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique
PGE2 : Prostaglandine
PON : Paraoxonases
PPAR γ : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma*
PQS : Pseudomonas Quinolone Signal (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone
PRR : *Pattern Recognition Receptors*
QQ : Quorum Quenching
QS : Quorum Sensing
RCH : Rectocolite Hémorragique
RCPG : Récepteur couplé à une protéine G
RE : réticulum endoplasmique
ROCK : Rho-associated protein kinase
ROS : *Reactive Oxygen Species*
SFB : bactéries filamenteuses segmentées
TFF3 : *TreFoil Factor 3*
TFH : T follicular helper cells
TGF- β : *Transforming Growth Factor β*
Th1 : T-helper 1
Th2 : T-helper 2
TLR : *Toll-Like Receptors*
TNF α : Tumor Necrosis-alpha
Treg : T régulateur
UPR : *unfolded protein response*
XBP1 : *Xbox Binding Protein 1*
ZO-1/2 : *Zonula Occludens 1 et 2*

LISTE DES FIGURES

Figures de l'introduction

Figure 1 : Organisation du système digestif et de la paroi intestinale	3
Figure 2 : Composition cellulaire de la barrière intestinale	5
Figure 3 : Organisation du tissu lymphoïde de l'intestin grêle	11
Figure 4 : Rôle des macrophages intestinaux en conditions physiologiques et en conditions inflammatoires	15
Figure 5 : Genre bactérien majoritaires et pH en fonction des segments de l'intestin	19
Figure 6 : Composition en bactéries du microbiote fécal humain décrits dans deux vastes études, Human Microbiome Project et Metagenomics of Human Intestinal Tract	20
Figure 7 : Comparaison de la composition en bactéries du microbiote et les fonctions qu'il exerce	22
Figure 8 : Vue d'ensemble de l'impact des fonctions du microbiote sur l'hôte	25
Figure 9 : Exemples de facteurs environnementaux ayant un impact sur le développement d'une maladie inflammatoire chronique intestinale	30
Figure 10 : Cytokines clés impliquées dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)	33
Figure 11 : Activation de la voie canonique et non-canonique NF- κ B	34
Figure 12 : Comparaison de la barrière intestinale à l'état sain et lors d'une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI)	37
Figure 13 : Arbre phylogénétique des espèces bactériennes associées aux maladies inflammatoires chroniques intestinales	40
Figure 14 : Dysbiose lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et impact sur l'hôte	43
Figure 15 : Facteurs impliqués dans la mise en place des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)	44
Figure 16 : Comparaison des changements dans l'intestin d'un sujet sain (panneau de gauche) vs patient IBD (panneau de droite)	45
Figure 17 : Mécanisme d'activation du Quorum Sensing	46
Figure 18 : Modèle de la synthèse et reconnaissance des AHLs dans une bactérie	50
Figure 19 : Les différents systèmes de Quorum Sensing présents chez la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Figure 20 : Effets des AHLs sur la fonction de barrière intestinale et sur la réponse immunitaire	64
Figure 21 : Signalisation canonique des récepteurs du goût amer	68
Figure 22 : Mise en évidence de la 3-oxo-C12:2-HSL dans l'écosystème intestinal humain	73

Liste des figures des résultats

Figure 23 : Effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur la sécrétion d'un panel de cytokines par les RAW264.7 sous forme de heatmap	128
---	-----

LISTE DES ABBREVIATIONS

Figure 24 : Présence de la 3-oxo-C12:2-HSL dans les fèces d'une souris gavée avec cette AHL	
Figure 25 : Variabilité du microbiote dans trois expériences menées indépendamment	125
Figure 26 : Impact des AHLs sur la composition du microbiote bactérien	133
Figure 27 : Effets de l'ACP sur la sécrétion d'un panel de cytokines par les RAW264.7 sous forme de heatmap	134
Figure 28 : L'ACP diminue l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages murins RAW264.7	135
Figure 29 : L'ACP diminue la sécrétion de TNF α par les cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC)	135
Figure 30 : L'ACP module l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation par les RAW264.7	137
Figure 31 : Mise au point de la dose de Dextran Sulfate Sodium (DSS) pour induire une colite inflammatoire chez la souris	139
Figure 32 : Effet de l'ACP et de la 3-oxo-C12:2-HSL sur la colite inflammatoire de souris	141
Figure 33 : Taux de cytokine dans le colon de souris traitées au DSS et aux AHLs	142
Figure 34 : Impact de l'ACP sur la composition du microbiote bactérien	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste non exhaustive des cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales intestinales.-----	12
Tableau 2 : Incidence et prévalence moyenne des de la Maladie de Crohn (MC) et de la Rectocolite Hémorragique (RCH) dans le monde, entre 1990 et 2017 -----	26
Tableau 3 : Sélection de cytokines dont la production est modulée lors des maladies inflammatoires chroniques intestinales -----	31
Tableau 4 : Dysbiose compositionnelle au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin-----	41
Tableau 5 : Vue d'ensemble des molécules utilisées par les bactéries pour leur Quorum Sensing -----	55
Tableau 6 : Tableau des effets de la 3-oxo-C12-HSL sur les cellules eucaryotes -----	62
Tableau 7 : barème utilisé pour établir le score de la colite inflammatoire déclenchée par le DSS.-----	138

PREFACE

Souvent considéré comme un organe à part entière, le microbiote intestinal est longtemps resté méconnu, essentiellement par manque d'outil adapté à son étude. Initialement limitée par les méthodes de culture traditionnelles, la description compositionnelle du microbiote a été rendue possible grâce à l'essor du séquençage à haut débit et d'outils informatiques à partir des années 1980 (découverte du 16S) et avec un regain dans les années 2000 (métagénomique). Avec le développement de nouveaux outils tels que la spectrométrie de masse et à la diminution des coûts, une approche plus fonctionnelle des micro-organismes du microbiote s'est développée. C'est notamment le cas pour certains métabolites ou co-métabolites bactériens comme les acides gras à chaîne courte et les acides biliaires qui font l'objet de nombreuses études. Tout comme la composition du microbiote est affectée chez les patients atteints de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), les fonctions portées par ce microbiote sont également modifiées, avec une diminution des acides biliaires secondaires par exemple. La description de ces fonctions altérées lors de pathologies permet d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques pour certaines maladies n'ayant actuellement aucun traitement curatif comme les MICI.

Au sein de notre équipe, nous étudions une classe particulière de métabolites bactériens les Acyl-Homosérine Lactones (AHLs), utilisées par les bactéries dans le cadre du Quorum Sensing ou dialogue inter-bactérien. Nous explorons ces molécules car il s'avère qu'elles exercent également des effets sur des cellules eucaryotes. Elles représentent à ce titre des molécules d'intérêt puisqu'on peut facilement imaginer que des anomalies compositionnelles du microbiote entraînent des anomalies de ces métabolites. Bien qu'elles soient fréquemment associées aux bactéries pathogènes, nous étudions l'effet éventuellement bénéfique de ces molécules dans le contexte des MICI. Notre étude a pour but de décrire les effets des AHLs sur l'hôte et leur implication dans ce dialogue inter-règne. La finalité est d'inclure ces données de façon écosystémique, permettant d'explorer les réseaux qui se créent entre l'hôte, son microbiote et les micro-organismes entre eux.

INTRODUCTION

I- L'intestin, organe complexe à l'interface de deux compartiments

A. Organisation générale de l'intestin

1. Structure macroscopique de l'intestin

Le tractus digestif est un organe tubulaire d'environ cinq mètres chez l'homme et permettant principalement la digestion des aliments : l'ingestion, le transport, la digestion, l'absorption et l'élimination. L'appareil digestif comprend des organes variés : la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon, le rectum et l'anus. Ces organes sont accompagnés de différentes glandes, permettant d'aider aux fonctions de l'appareil digestif. Parmi ces organes qualifiés d'annexes, mais pour certains vitaux, il y a les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire, le pancréas (Figure 1A).

L'intestin grêle commence à la sortie de l'estomac, au niveau du pylore, et est divisé en plusieurs parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le cæcum reçoit l'iléon terminal et constitue le début du colon, lui-même subdivisé en côlon ascendant, côlon transverse puis côlon descendant. Le colon se poursuit par le rectum et se termine par l'anus.

La paroi de l'intestin grêle et du côlon est organisée en différentes couches concentriques (Figure 1B) : la couche externe, musculuse, permettant le péristaltisme et la progression du bol alimentaire, la sous-muqueuse puis la muqueuse, au contact de la lumière intestinale. La muqueuse est elle-même formée de différentes couches, de la plus interne vers la lumière :

- la musculaire muqueuse
- la lamina propria (aussi appelée chorion), tissu conjonctif abritant le système immunitaire intestinal ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques.
- une lame basale, matrice extracellulaire spécialisée située à l'interface épithélium/tissu conjonctif
- A partir de l'estomac, l'épithélium digestif, en contact avec la lumière est un épithélium simple prismatique, composé de différentes cellules épithéliales spécialisées.

Le rôle principal de l'intestin grêle est d'absorber les nutriments présents dans la lumière intestinale, ainsi est-il nécessaire d'avoir une surface d'échange la plus grande possible. Cela se traduit par une organisation de la muqueuse en villosités et la présence des microvillosités à la surface des entérocytes, formant une bordure en brosse. Le côlon ne possède pas une surface d'échange si importante, étant donné que sa fonction est plutôt de réabsorber l'eau et des électrolytes, mais les colonocytes, cellules épithéliales principales du côlon, possèdent

également des microvillosités (plus courtes que dans l'intestin grêle) (Helander and Fändriks, 2014). Il a souvent été cité que la surface d'échange de l'intestin était de l'ordre de la surface d'un terrain de tennis (300 m²), mais une revue récente a ré-estimé que la superficie serait plutôt de 32 m² (Helander and Fändriks, 2014).

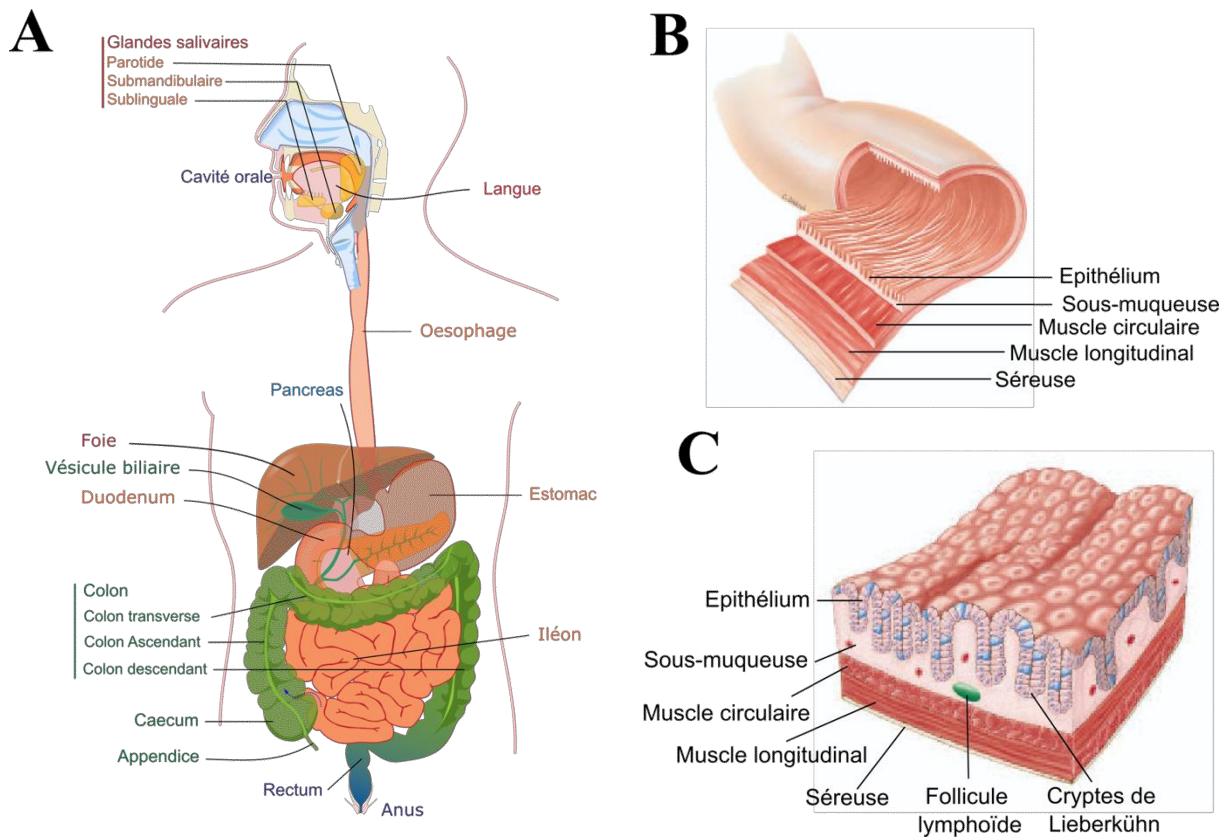


Figure 1 : Anatomie et histologie du système digestif

A : Anatomie du système digestif humain L'intestin grêle comporte des villosités afin d'augmenter la surface d'échange pour l'absorption des nutriments *d'après Mariana Ruiz* **B : Feuilles de l'intestin** L'intestin est composé de différents feuillets de la lumière vers l'intérieur : l'épithélium simple, la muqueuse, le muscle circulaire, le muscle longitudinal et la séreuse *adapté de (Seeley et al., 2003)* **C : Histologie du côlon** Section transverse du côlon permettant d'apprécier les cryptes de Lieberkühn et la structure de la sous-muqueuse comprenant les follicules lymphoïdes. *adapté de (Seeley et al., 2003)*

2. Structure tissulaire et cellulaire de l'épithélium intestinal

La structure de l'intestin est différente selon les régions considérées. L'intestin grêle présente des villosités, projections de la muqueuse dans la lumière, et des cryptes de Lieberkühn, qui sont au contraire des invaginations de celle-ci (Figure 2A). Le côlon possède également des cryptes, mais pas de villosités (Figure 1C et 2B). A la base de ces cryptes les cellules souches intestinales peuvent se différencier tout en migrant le long de la crypte vers la lumière (Peterson and Artis, 2014). A la surface, les cellules se détachent et subissent une mort

cellulaire en se détachant de l'épithélium : l'anoïkis. La différenciation des cellules épithéliales intestinales permet de générer différentes cellules spécialisées (Figure 2A, 2B et 2C) :

- Les **entérocytes**, cellules majoritaires de l'intestin, jouent un rôle important d'absorption des nutriments et de l'eau. Dans le côlon, ces cellules sont appelées **côlonocytes**.
- Les **cellules à mucus**, ou cellules caliciformes, sont intercalées entre les entérocytes. Elles produisent spécifiquement les mucines, glycoprotéines constituant le mucus recouvrant l'épithélium. La protéine la plus abondante est MUC2 (Goll and van Beelen Granlund, 2015).
- Les **cellules de Paneth** sont situées au fond des cryptes et produisent des peptides antimicrobiens (Voir I-B-1-ii). Les cellules de Paneth sont principalement retrouvées dans l'intestin grêle, mais également, en minorité, dans le côlon ascendant. Il est intéressant de noter qu'une cellule de Paneth a environ une durée de vie d'une soixantaine de jours (Ireland *et al.*, 2005), comparé aux entérocytes dont le renouvellement est beaucoup plus rapide, de l'ordre de quelques jours (Goll and van Beelen Granlund, 2015).
- Les **cellules entéro-endocrines** sont parsemées sur l'axe crypto-villositaire. Elles ont un rôle de communication, en transmettant des signaux mécaniques et chimiques grâce à des systèmes paracrines, endocrines ou neuraux.
- Les **cellules tuft** ont un rôle chimio-senseur, notamment contre les parasites.
- Les **cellules M** (*microfold cells*) permettent le transport des antigènes de la lumière vers la lamina propria pour l'interaction avec le système immunitaire. Ce type de cellule est retrouvé dans l'épithélium associé aux plaques de Peyer et est généralement absent du côlon (Allaire *et al.*, 2018)

3. Fonctions de l'intestin

L'intestin possède plusieurs fonctions. La principale est la **fonction d'absorption** des nutriments. Les entérocytes expriment sur leur pôle apical et baso-latéral des transporteurs permettant de transférer les molécules nutritives de la lumière vers le compartiment intérieur et la circulation sanguine, selon des mécanismes essentiels et complexes qui ne seront pas abordés dans cette thèse.

La **fonction endocrine** est rendue possible grâce à la différenciation des cellules entero-endocrines. Ces dernières sécrètent une vingtaine d'hormones peptidiques dont les cibles sont

autant intestinales que systémiques. Les principales hormones sont le Glucagon-Like Peptide 1 (GLP1) et la Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP), qui sont synthétisées en réponse à un repas, pour stimuler la sécrétion d'insuline (Gribble and Reimann, 2019).

La **fonction de barrière** est un paramètre important et finement régulé dans la physiologie de l'intestin. Sa présence permet de séparer le contenu de la lumière, milieu complexe, du compartiment intérieur.

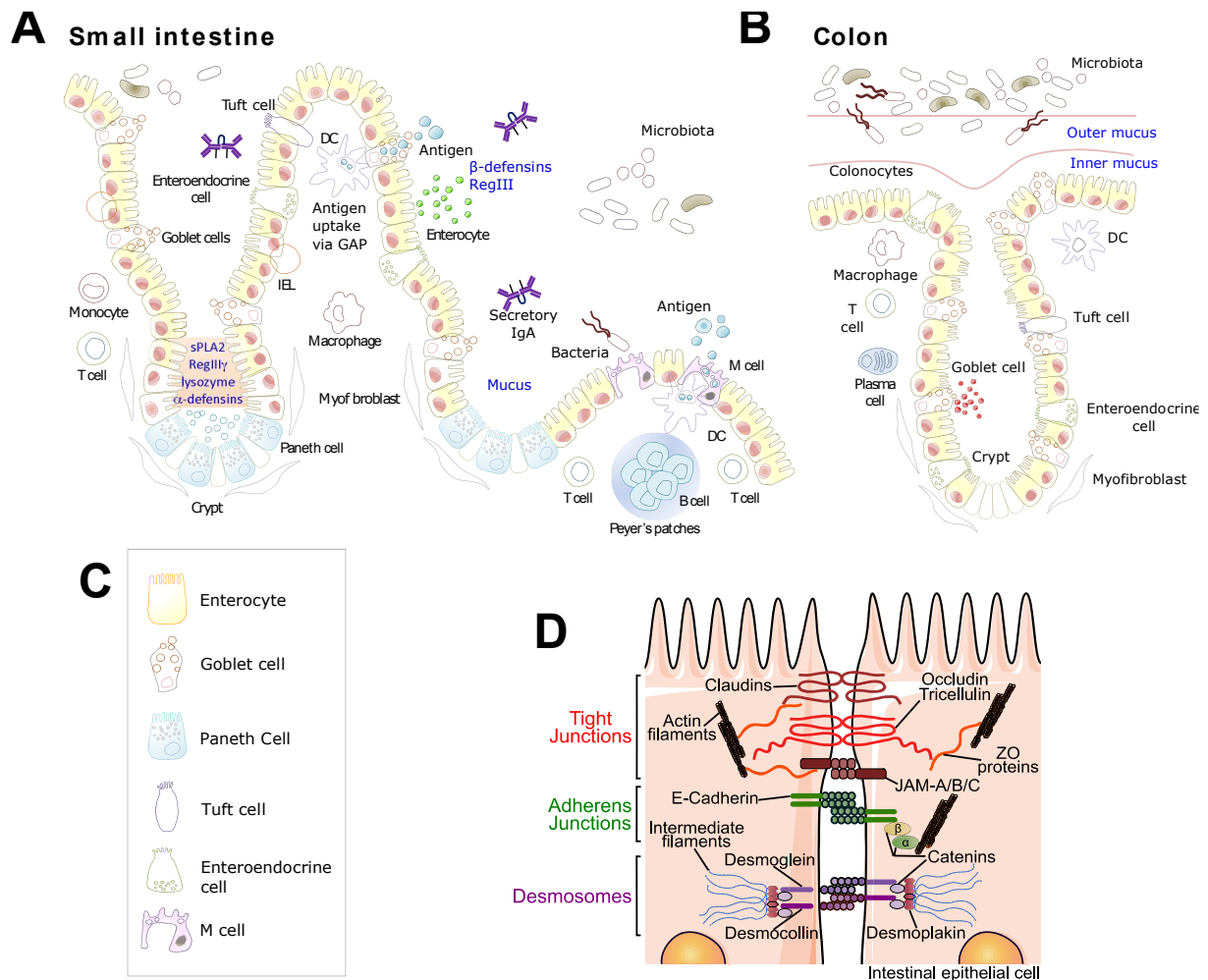


Figure 2 : Composition cellulaire de la barrière intestinale

A : Structure de l'intestin grêle L'intestin grêle comporte des villosités afin d'augmenter la surface d'échange pour l'absorption des nutriments *adapté de Allaire et al., 2018* **B : Structure du côlon** *adapté de Allaire et al., 2018* Le côlon, dépourvu de villosité, permet la réabsorption d'eau **C : Légende de la figure A et B** Cellules épithéliales présentes dans l'intestin *adapté de Allaire et al., 2018*. **D : Complexe jonctionnel apical des cellules épithéliales intestinales.** Les jonctions intercellulaires permettent de conserver une relative étanchéité sélective de la barrière intestinale. *adapté de Le Gall et al., 2019*

DC : cellule dendritique ; IEL : lymphocyte intraépithélial ; IgA : Immunoglobuline A

B. La muqueuse intestinale et son système immunitaire

1. La barrière intestinale

Du fait de la vaste surface de l'intestin et de la présence d'un environnement complexe dans la lumière intestinale, comprenant de nombreux micro-organismes et antigènes, la barrière intestinale et son intégrité sont primordiales. Il est important de noter que la barrière intestinale n'est pas absolue ; il existe une étanchéité relative et une perméabilité sélective. On parle de « fonction de barrière » et celle-ci met en jeu plusieurs acteurs qui seront décrits ici successivement :

- la barrière écologique, comprenant les micro-organismes du microbiote
- la barrière chimique
- la barrière physique
- la barrière immunologique (Voir I-B.2)

i. Barrière écologique

Les bactéries commensales du microbiote participent à la lutte contre les infections par des bactéries pathogènes, par **compétition** pour les nutriments en constituant ainsi une niche écologique (Lozupone *et al.*, 2012).

D'autre part, le microbiote stimule la sécrétion de peptides anti-microbiens (PAMs) (voir B-1-ii) comme les Lectines ou les Défensines par les cellules de Paneth, grâce à une reconnaissance des **Pattern Recognition Receptors** (PRR), exprimés par les cellules épithéliales (Jandhyala, 2015). Il a été montré que certaines bactéries du microbiote peuvent stimuler la production d'Immunoglobuline A (IgA). En effet, les bactéries du phylum *Bacteroides* peuvent stimuler les cellules dendritiques qui induisent la sécrétion d'**IgA** par les plasmocytes intestinaux dispersés dans la muqueuse intestinale (Voir I-B.1.ii) (He *et al.*, 2007).

Certaines bactéries peuvent également produire des molécules antibactériennes telles que des **bactériocines**, capables d'interférer avec le métabolisme bactérien de l'ADN, des ARN et des protéines ou de cibler directement la membrane bactérienne. Ces bactériocines des bactéries Gram négatif ou positif sont différentes selon leurs modifications post-traductionnelles (Chung and Raffatellu, 2019).

L'ensemble de ces facteurs participent à cette barrière écologique, premier rempart face aux microorganismes pathogènes.

ii. Barrière chimique

Dans ce contexte, les cellules de Paneth ont un rôle crucial en sécrétant de nombreux PAMs, molécules hautement conservées à travers l'évolution, démontrant leur caractère essentiel pour la physiologie. Ces PAMs peuvent agir par plusieurs mécanismes, en

déstabilisant la structure bactérienne ou en séquestrant les nutriments essentiels (Chung and Raffatellu, 2019).

Les **défensines** sont des protéines divisées en trois catégories, en fonction de leur structure (α , β et θ). Les α -défensines sont principalement produites par les cellules de Paneth, les β -défensines par les entérocytes de l'intestin grêle et du côlon tandis que les θ -défensines ont seulement été décrites chez les primates non-humains. Chez la souris, les α -défensines sont appelées cryptidines (Chung and Raffatellu, 2019). Ces protéines s'agrègent sur la paroi bactérienne et forment des structures proches de pores, induisant une déstabilisation de la membrane. Par ce mécanisme, elle peuvent cibler les bactéries Gram positives et négatives (Okumura and Takeda, 2018). La stimulation de leur production est directement due à la présence de bactéries mais aussi de métabolites bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) (Cheng *et al.*, 2019).

Les **cathélicidines** sont des protéines synthétisées par les colonocytes et fonctionnent comme les α -défensines (Chung and Raffatellu, 2019).

Les **lectines** de type C sont exprimées par plusieurs types cellulaires dans l'intestin. Parmi elles, RegIII γ agit sur les bactéries Gram positives en adhérant aux peptidoglycanes de la paroi bactérienne et en la perméabilisant par formation de pores hexamériques (Okumura and Takeda, 2018). En conditions physiologiques, RegIII γ permet de maintenir une séparation physique entre le microbiote et les cellules épithéliales.

Le **lysozyme** est sécrété principalement par les cellules de Paneth mais aussi par les entérocytes. Son action est enzymatique ; il lyse les liaisons entre les peptidoglycanes de la membrane bactérienne. Son activité est optimisée par la sécrétion par les cellules de Paneth de la phospholipase A2, qui détruit les phospholipides de la membrane (Chung and Raffatellu, 2019).

Il a récemment été mis en évidence que les **chimiokines**, molécules orchestres de la réponse immunitaire, peuvent également jouer un rôle anti-microbien. C'est le cas des chimiokines CXCL9, CXCL10, CXCL11, synthétisées par les cellules épithéliales. Elles agissent en détruisant la membrane bactérienne ou en ciblant la production d'enzymes et de transporteurs bactériens (Chung and Raffatellu, 2019).

iii. Barrière physique

Au-delà des cellules épithéliales, il existe plusieurs éléments extra-cellulaires participant à la barrière physique.

Le Mucus

Comme la plupart des muqueuses, la muqueuse intestinale est recouverte de **mucus**, dont les constituants sont en grande partie sécrétés par les cellules caliciformes. Ce mucus empêche que les bactéries et particules présentes dans la lumière ne soient en contact direct avec l'épithélium (Turner, 2009). Cette première ligne de défense est un gel aqueux composé de **mucines** qui sont des protéines hautement glycosylées, permettant de créer des polymères. La formation d'un réseau de mucines est possible grâce à des ponts disulfures et à la sécrétion, par les cellules à mucus, de facteurs tels que *TreFoil Factor 3* (TFF3) qui favorise les liens pour la formation des polymères (Peterson and Artis, 2014). La mucine la plus exprimée est **MUC2**, et son importance a été démontrée, notamment chez des souris invalidées pour le gène *Muc2*, qui vont développer spontanément une colite (Van der Sluis *et al.*, 2006).

Dans le côlon, le mucus forme deux couches (Figure 2B) : une couche externe épaisse et qui contient des bactéries, et une couche interne, plus fine, au contact de la muqueuse, dépourvue de bactérie grâce à la présence de PAMs (Goll and van Beelen Granlund, 2015). Une étude a démontré que ce système était en partie « inductible » : la présence de **cellules à mucus sentinelles** à l'entrée des cryptes dans le côlon, permet la détection de micro-organismes ce qui entraîne une sécrétion augmentée de mucus afin de protéger les cryptes des micro-organismes (Birchenough *et al.*, 2016). La production de mucus est dynamique et fréquemment renouvelée afin de répondre aux modifications de l'environnement telles qu'un changement de régime par exemple. Chez l'homme, l'épaisseur de ce mucus varie le long du tractus digestif, de 150µm dans l'intestin grêle à 700µm dans le côlon, ce qui est corrélé avec le nombre de micro-organismes présents dans la lumière (Corfield, 2018).

Les jonctions inter-cellulaires

L'épithélium intestinal forme une barrière physique et mécanique, rendue possible notamment grâce aux jonctions intercellulaires (Figure 2D). Trois types de jonctions permettent de garder les cellules épithéliales polarisées cohésives entre elles : les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions serrées, formant le complexe apical jonctionnel. Les jonctions intercellulaires sont des complexes de protéines reliés au cytosquelette, permettant d'assurer plusieurs fonctions : transduction du signal, polarisation des cellules, adhésion cellule-cellule et fonction de barrière. Cette dernière est assurée par les jonctions serrées, permettant la relative étanchéité et la sélectivité de la barrière intestinale. Les protéines jonctionnelles sont finement régulées par phosphorylation notamment (Okumura and Takeda, 2018).

Les **jonctions adhérentes** sont composées de **cadhérines**, protéines transmembranaires dépendantes du calcium, qui interagissent de façon homophile avec les cadhérines des cellules adjacentes (Figure 2D). Dans les cellules épithéliales, la cadhérine majoritaire est la E-cadhérine. Du côté cytoplasmique, les molécules de E-cadhérine sont liées aux β -caténines, elles même interagissant avec les α -caténines. Ces dernières se lient à l'actine et permettent la formation d'une ceinture d'actine (Turner, 2009).

Les **desmosomes** permettent une adhésion cellule-cellule forte et résistante aux stress mécaniques auxquels l'épithélium intestinal est soumis (Odenwald and Turner, 2016) Les desmosomes sont composés de cadhérines desmosomales : desmogleines et desmocollines, associées à des protéines cytoplasmiques de la famille des caténines, ce complexe étant relié aux kératines, filaments intermédiaires du cytosquelette (Odenwald and Turner, 2016).

Les **jonctions serrées** sont également constituées de plusieurs protéines (Figure 2D). Les **claudines** et l'**occludine** sont les protéines transmembranaires, liées dans le cytoplasme à des protéines d'échafaudages nommées *Zonula Occludens* 1 et 2 (**ZO-1**, **ZO-2**). On peut noter la présence de la tricelluline aux jonctions tricellulaires, créant un canal pour le passage des macromolécules, ce qui implique directement cette protéine dans la fonction de barrière (Higashi and Miller, 2017). Les protéines ZO interagissent dynamiquement avec le cytosquelette d'**actine** dans le cytoplasme (Slifer and Blikslager, 2020).

La fonction de barrière est certes contrôlée par les jonctions serrées, mais il est important de noter qu'une altération d'un type de jonction intercellulaire entraîne une réorganisation des autres jonctions (Niessen, 2007)

Le passage à travers l'épithélium intestinal met en jeu différentes voies de transport :

- La **voie paracellulaire** passive, entre les cellules, est contrôlée spécifiquement par les jonctions serrées. Elle est divisible en deux catégories :
 - o Le « leak pathway » permettant le passage de macromolécules telles que des protéines, mais avec une faible capacité
 - o Le « pore pathway » grâce aux pores formés par les protéines des jonctions serrées bicellulaires et tricellulaires. Ce passage est sélectif sur la taille et la charge des molécules, permettant le transport d'ions et de petites molécules.
- La **voie transcellulaire** active ou passive, grâce à des transporteurs ou par canaux.

La notion de sélectivité est importante pour la barrière intestinale qui ne doit pas être vue comme absolue et complètement étanche. Cette perméabilité sélective est indispensable pour l'absorption de certains nutriments, mais aussi pour l'éducation du système immunitaire (Anderson and Van Itallie, 2009).

2. Le système immunitaire intestinal

Des publications montrent que 70% des lymphocytes du corps humain sont présents dans le tractus digestif (Takiishi *et al.*, 2017), ce qui illustre l'importance du système immunitaire intestinal dans la physiologie humaine.

Plusieurs propriétés du système immunitaire intestinale sont importantes, notamment le fait de discriminer les micro-organismes commensaux des pathogènes. Ce système doit également faire preuve de **flexibilité** face à un environnement en changement constant ; l'évolution des micro-organismes est plus rapide que celle de l'hôte. La **mémoire** est une caractéristique importante du système immunitaire, protégeant à la fois l'individu mais aussi une population entière (Nicholson, 2016).

Afin d'assurer une coordination optimale, des **cytokines** et des **chimiokines** sont sécrétées pour orchestrer les réponses. Les cytokines sont des protéines médiatrices formant un réseau de communication entre cellules (Nicholson, 2016). Les **chimiokines** sont des petites protéines ayant des propriétés chimiotactiques, attirant les cellules nécessaires à l'endroit de l'inflammation. Les cellules immunitaires ne sont pas les seules à être impliquées dans la réponse immunitaire ; la plupart des cellules non-immunitaires possèdent des capacités d'immunorégulation et peuvent sécréter certaines cytokines et chimiokines.

Nous nous intéressons ici au système immunitaire présent dans l'intestin, qui s'organise en **Gut-Associated Lymphoid Tissue** (GALT). Le GALT est divisé en trois structures présentes dans l'épithélium et la lamina propria : les **plaques de Peyers** (follicules lymphoïdes présents dans le jéjunum et surtout l'iléon distal), les **follicules lymphoïdes isolés** et les **ganglions mésentériques lymphatiques** (Figure 3).

i. Système immunitaire inné de l'intestin

Les cellules de l'immunité innée expriment des récepteurs appelés *Pattern Recognition Receptors* (PRR), et plus spécifiquement les **Toll-Like Receptors** (TLR) transmembranaires et les NLR (NOD-Like Receptor) intracellulaires. Les TLRs ont la capacité de reconnaître les **Pathogen-Associated Molecular Patterns** (PAMPs) ou MAMPs (**Microbial-Associated Molecular Patterns**), molécules présentes dans la structure même des micro-organismes.

Le Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2 (**NOD2**) est un récepteur intra-cellulaire de dérivés de peptidoglycanes bactériens (Al Nabhani *et al.*, 2017). Ils sont exprimés par de nombreuses cellules de la muqueuse intestinale, dont les cellules immunitaires, mais aussi les entérocytes (Al Nabhani *et al.*, 2017). Lors de son activation, NOD2 active les voies de l'inflammation NF- κ B et MAPK, entraînant la synthèse de cytokines et de molécules anti-microbiennes (Al Nabhani *et al.*, 2017).

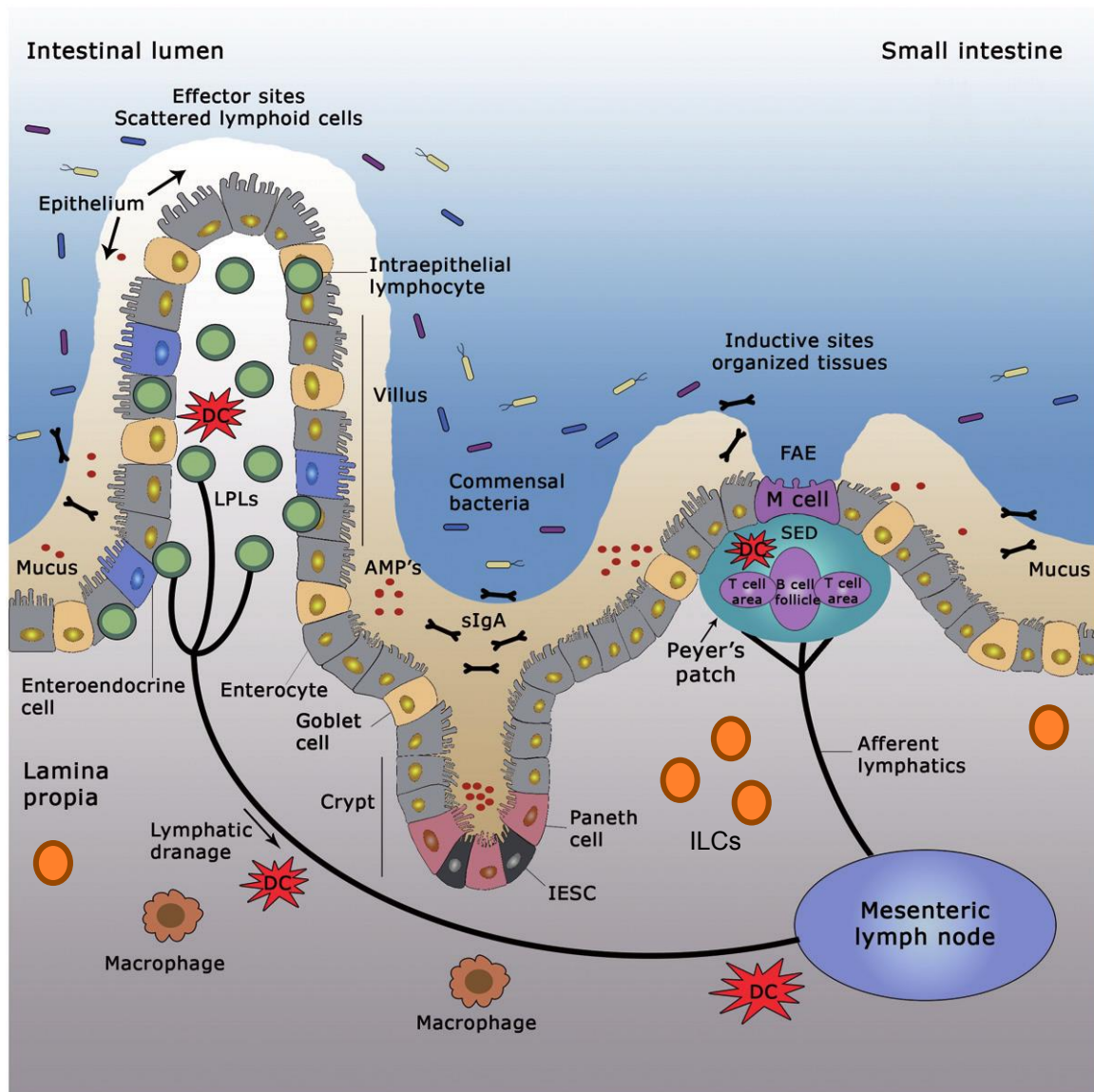


Figure 3 : Organisation du tissu lymphoïde de l'intestin grêle.

Le Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT) est organisé autour de trois structures : les plaques de Peyer, les ganglions mésentériques lymphatiques et les follicules lymphoïdes isolés.

sIgA : Immunoglobines A solubles; AMP : peptide anti-microbien; DC : Cellule Dendritique; ILCs : follicules lymphoïdes isolées; IESC : cellules épithéliale souche intestinale; LPL : Lymphocytes de la Lamina Propria d'après Ahluwalia *et al.*, 2017

Les TLR sont capables de discriminer les MAMPs des micro-organismes commensaux des pathogènes, mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore connus. De façon intéressante, les cellules épithéliales expriment également des PRR afin de reconnaître et déclencher une réponse innée anti-microbienne (Ahluwalia *et al.*, 2017). La localisation des TLR est polarisée dans les cellules épithéliales intestinales pour éviter l'activation inutile de ces récepteurs (McClure and Massari, 2014). Un même récepteur, par exemple TLR9, situé sur le pôle

basolatéral des cellules épithéliales intestinales active la voie inflammatoire NF- κ B, tandis que lorsque TLR9 est placé en apical, il est répresseur de cette même voie (Peterson and Artis, 2014). Le TLR4 peut même être exprimé de façon intra-cellulaire, afin de limiter une réponse trop forte au LPS, son ligand principal (Hornef *et al.*, 2002; Naik *et al.*, 2001).

Dans l'intestin, les **cellules épithéliales** peuvent donc être considérées comme faisant partie du système immunitaire inné. Elles constituent une barrière physique, tout en synthétisant des peptides anti-microbiens et du mucus (Brown *et al.*, 2013). Les cellules épithéliales ont également un rôle de senseurs, en exprimant des récepteurs. L'épithélium synthétise des cytokines et chimiokines, pouvant alerter et attirer les autres cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale (Shi *et al.*, 2017). Une liste extensive des différentes cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales intestinales est présentée dans le tableau 1.

Types de cytokine	Exemples d'Effets sur l'immunité	Référence
CXCL1 CXCL3 CXCL5 CXCL 8 (IL-8)	Chimioattractant pour neutrophiles	(Kagnoff, 2014)
CCL2 (monocyte chemotactic protein-1) CCL3 (macrophage inflammatory protein 1- α) CCL5 (RANTES)	Chimioattractant pour macrophages et cellules dendritiques	(Kagnoff, 2014; Vijay-Kumar <i>et al.</i> , 2014)
CCL20	Chimioattractant pour cellules dendritiques et lymphocytes T mémoire	(Kagnoff, 2014)
CCL22	Chimioattractant pour cellules dendritiques et lymphocytes Th2	(Kagnoff, 2014)
CXCL9 CXCL10 CXCL11	Chimioattractant pour lymphocytes Th1	(Kagnoff, 2014)
CCL28	Chimioattractant pour cellules plasmatisques	(Kagnoff, 2014)
TNF α	Amplifie la réponse pro-inflammatoire	(Jung <i>et al.</i> , 1995; Kagnoff, 2014; Vijay-Kumar <i>et al.</i> , 2014)
GM-CSF	promotes the survival and activation of macrophages and granulocytes	(Jung <i>et al.</i> , 1995; Kagnoff, 2014)
IL-6	Stimule une réponse pro-inflammatoire	(Vijay-Kumar <i>et al.</i> , 2014)
IL-1 β	Stimule une réponse pro-inflammatoire	(Stadnyk, 2002)
TGF β	Stimule la prolifération des lymphocyte T et la production d'IgA par les cellules plasmocytes	(Stadnyk, 2002)

Tableau 1 : Liste non exhaustive des cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales intestinales humaines. Ce tableau illustre l'importance des cellules épithéliales dans la coordination de la réponse immunitaire.

Bien d'autres cellules également présentes dans la muqueuse intestinale participent à la réponse immunitaire innée : les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules lymphoïdes innées comprenant les *Natural Killer* (NK). Les monocytes, les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles sont des phagocytes ; ils peuvent ingérer les particules étrangères sous forme de phagosome qui va fusionner avec un lysosome, formant un phagolysosome (Murray and Wynn, 2011). Ce processus est accompagné d'une libération de cytokines pro-inflammatoires (Murray and Wynn, 2011).

Les **cellules lymphoïdes innées** (ILCs) sont des cellules qui ont été étudiées relativement récemment. Les ILCs n'expriment pas de récepteur spécifique comme les autres lymphocytes. Ce sont des cellules résidentes dans les tissus dont l'intestin (Tait Wojno and Artis, 2012) et répondant rapidement à un stimulus (Fan *et al.*, 2019). Les ILCs sécrètent différentes cytokines, selon leur classe (ILC1, ILC2, ILC3) et coopèrent avec les autres cellules de l'immunité innée afin d'optimiser la réponse inflammatoire (Fan *et al.*, 2019).

Les **neutrophiles** sont les premières cellules immunitaires à infiltrer les parties enflammées de l'intestin. Une fois activés par un stimulus bactérien, ils vont limiter l'invasion des bactéries en ayant une forte activité phagocytaire. Les neutrophiles n'agissent pas seulement en phase aiguë de l'inflammation, mais dialoguent également avec les cellules alentours : les cellules épithéliales, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes... Ce dialogue passe par des interactions directes cellule-cellule ou par sécrétion de cytokines et chimiokines (Schoultz and Keita, 2019).

Les **monocytes** circulants se différencient dans les tissus en cellules dendritiques et en macrophages. Ces cellules ont la particularité d'être des Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) enclenchant ainsi les réponses immunitaires adaptatives. Ces cellules ont un double rôle dans l'intestin ; maintenir une tolérance face aux micro-organismes commensaux, tout en étant capables de déclencher une réaction inflammatoire face à un pathogène.

Les **cellules dendritiques** (DCs) jouent un rôle de sentinelle dans l'intestin ; ce sont des CPAs par excellence et ont la capacité d'activer les lymphocytes T naïfs, présents dans les ganglions lymphatiques, pour activer la réponse immunitaire adaptative, notamment en orientant une réponse Th1, Th2, Th17 ou Treg (voir I-B-2-ii). Physiologiquement, les antigènes peuvent emprunter plusieurs voies pour passer la barrière intestinale. Ils peuvent être transportés par les cellules M (voir I-A-2), mais aussi via les DCs, qui peuvent étendre leurs dendrites pour sonder le contenu intestinal en passant entre les cellules épithéliales afin de capturer les antigènes dans la lumière intestinale (Ahluwalia *et al.*, 2017). Il a aussi été montré que les cellules à mucus peuvent contribuer au transfert des antigènes de la lumière vers la

muqueuse, directement vers les DCs (McDole *et al.*, 2012). Les DCs peuvent être divisés en plusieurs sous-types en fonction de leur maturité et des récepteurs membranaires exprimés (Coombes and Powrie, 2008).

Les **macrophages** font partie des cellules les plus abondantes dans la lamina propria des mammifères sains et en font donc un réservoir important de l'organisme. Le nombre de macrophages présents dans la muqueuse intestinale semble corrélé au nombre de micro-organismes présents dans la lumière intestinale, et atteint donc un maximum dans le côlon (Vijay-Kumar *et al.*, 2014). Les macrophages résidents de l'intestin en situation physiologique ont un profil anti-inflammatoire (Isidro and Appleyard), qui sont capable de s'auto-renouveler à partir de progéniteurs présents dans la lamina propria (Figure 4) (De Schepper *et al.*, 2018). En revanche, lors d'épisodes inflammatoires tels que rencontrés lors des MICI, les macrophages polarisés pro-inflammatoires sont plus nombreux, avec d'une part des macrophages résidents qui ont changé de phénotype, mais avec également l'afflux de monocytes circulants se différenciant en macrophages (Isidro and Appleyard).

Les macrophages participent fondamentalement à la physiologie intestinale, permettant de contrôler les réponses inflammatoires en neutralisant les potentielles menaces ayant franchi la barrière intestinale (Vijay-Kumar *et al.*, 2014), mais aussi en assurant des fonctions retrouvées dans tous les autres tissus comme l'élimination des cellules apoptotiques ou les débris cellulaires (Bain and Mowat, 2014).

Les macrophages de l'intestin sont situés à proximité de la monocouche de cellules épithéliales, faisant d'eux des spécialistes de la capture et de la neutralisation de particules étrangères ayant passé l'épithélium (Figure 4) (Bain and Mowat, 2014). Une caractéristique essentielle des macrophages intestinaux est l'**anergie**, leur capacité à ne pas déclencher une réaction inflammatoire lorsque les TLRs ou les récepteurs NOD sont activés, et donc ne pas déclencher de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL-6 (Smythies *et al.*, 2005). Il a été montré que les macrophages sécrètent de façon constitutive de faibles doses de TNF α et l'interleukine-10 (IL-10) une cytokine anti-inflammatoire majeure dans la régulation de la réponse immunitaire (Vijay-Kumar *et al.*, 2014). En effet, des souris invalidées pour le gène codant l'IL-10 développent spontanément une colite (KJhn *et al.*).

Bien que les macrophages ne soient pas aussi efficaces que les DCs dans l'induction de la réponse adaptatrice, il a été montré qu'ils avaient un rôle dans le maintien des lymphocytes Treg dans la muqueuse grâce à la synthèse d'IL-10 (Kim *et al.*, 2018) et des lymphocytes Th17

grâce à l'IL-1 β (Panea *et al.*, 2015). Indirectement, les macrophages affectent la différenciation des lymphocytes T en transférant les antigènes aux DCs qui vont migrer et activer les lymphocytes T (Bain and Schridde, 2018).

Au-delà de leur rôle immunologique, les macrophages participent également au renforcement de la barrière intestinale. En effet, ils synthétisent la Prostaglandine E2 (PGE2) qui stimule la prolifération des progéniteurs épithéliaux dans les cryptes (Bain and Mowat, 2014).

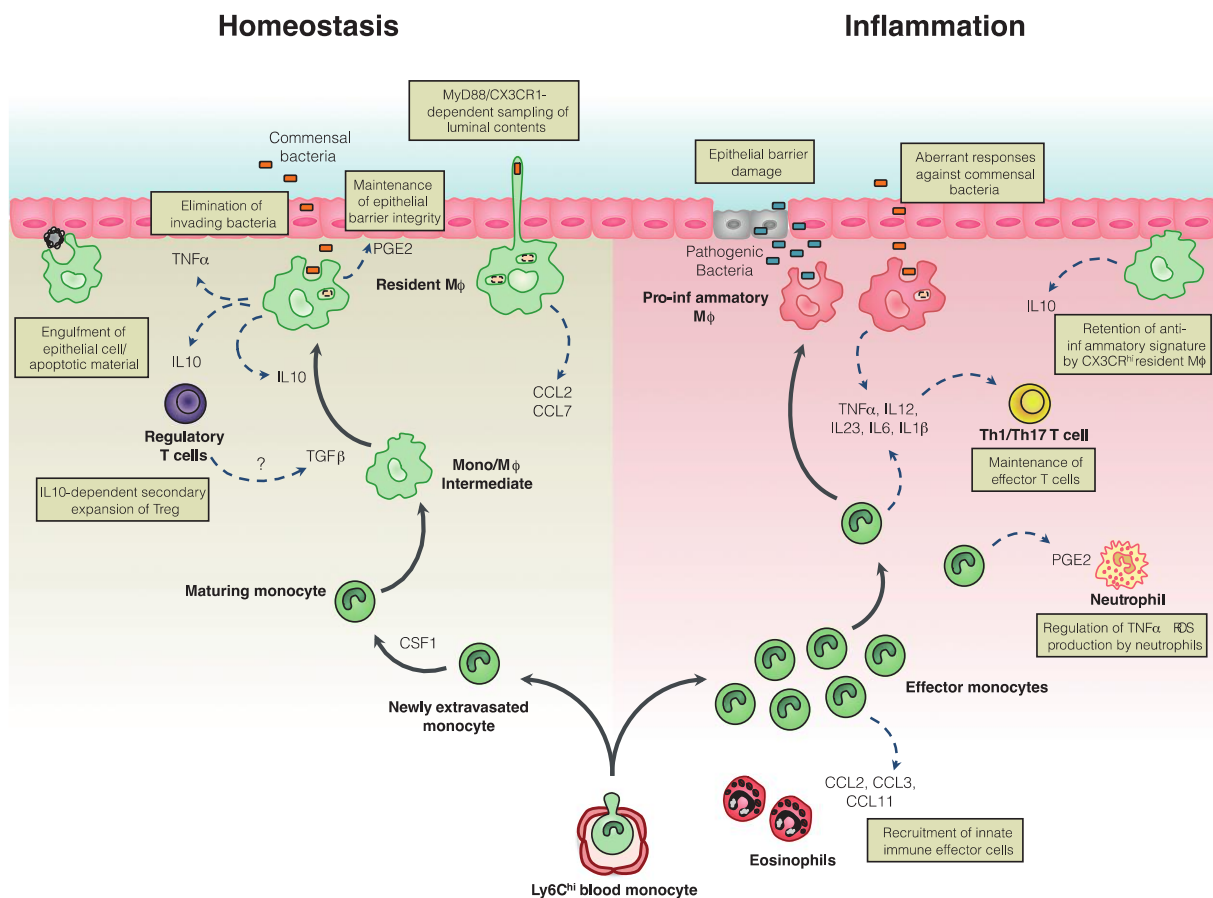


Figure 4 : Rôle des macrophages intestinaux en conditions physiologiques et en conditions inflammatoires

Les macrophages résidents sont situés directement sous les cellules épithéliales afin de détecter et phagocyter toute particule étrangère ou cellule sénescence. Ils sécrètent également des cytokines et des prostaglandines E2 (PGE2). Parmi les cytokines sécrétées, l'interleukine 10 (IL-10) permet d'induire les lymphocytes T régulateurs, pouvant eux-mêmes induire la différenciation des macrophages résidents. En cas d'infection, les macrophages acquièrent un phénotype pro-inflammatoire, avec notamment la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces dernières recrutent des cellules effectrices telles que les lymphocytes Th17 ou Th1. Des macrophages résidents peuvent cependant continuer à jouer un rôle anti-inflammatoire en sécrétant de l'IL-10.

M ϕ : Macrophage; TNF α : Tumor Necrosis Factor-alpha; IL-10 : Interleukine-10; PGE2 : prostaglandine E2; CCL2 : chimiokines ligand 2 *adapté de Bain and Mowat, 2014.*

L'**inflammasome** est un complexe protéique récemment identifié qui reconnaît les signaux délétères tels que le stress, les particules microbiennes ou des molécules endogènes. Il est composé entre autre d'une protéine senseur, une protéine adaptatrice et une caspase inflammatoire, la caspase 1 (Elinav *et al.*, 2013). Ce complexe est présent dans de multiples cellules, dont les cellules hématopoïétiques et les cellules épithéliales (Elinav *et al.*, 2013). En réponse à un stimulus, il déclenche l'activation de la caspase 1 et la production d'IL-1 β et d'IL-18. L'activation de la caspase induit la pyroptose, une mort cellulaire lytique et pro-inflammatoire (Lamkanfi and Dixit, 2014).

Au cours de l'inflammation, différentes morts cellulaires ont lieu (apoptose, nécrose, nécroptose, pyroptose) déclenchant le relargage de molécules intra-cellulaires ayant des propriétés pro-inflammatoires. Ces molécules sont appelées *Damage-associated molecular patterns* (**DAMPs**) ou alarmines. Les DAMPs peuvent déclencher une inflammation indépendamment de l'implication de micro-organismes, et activer les TLR. La variété de DAMPS est considérable, incluant des protéines (défensines, cytokines...), des lipoprotéines, des acides gras, des acides nucléiques... (de Souza and Fiocchi, 2016).

ii. Système immunitaire adaptatif de l'intestin

En parallèles des cellules du système immunitaire inné, la lamina propria contient des cellules de l'immunité adaptative dont des Lymphocytes T CD4+, des lymphocytes cytotoxiques CD8+ et des plasmocytes (Ahluwalia *et al.*, 2017). Les plasmocytes sont des lymphocytes B différenciés pour produire des Immunoglobulines (Ig) notamment des IgA .

Les **lymphocytes T** (LT) de l'intestin, les plus nombreux de l'organisme, sont en grande majorité des cellules qui ont été en contact avec un antigène, grâce aux CPAs. Une fois activés, les LT se différencient ensuite en fonction de leur signal d'activation : T-helper 1 (Th1), T-helper 2 (Th2), T-helper 17 (Th17), T follicular helper cells (TFH) et T régulateur (Treg). Par exemple, une production d'IL-12 par les DCs entraîne une réponse Th1 tandis qu'une synthèse d'IL-4 détermine une réponse Th2. Une fois activés dans les ganglions lymphoïdes, les lymphocytes migrent vers le lieu de l'inflammation (Ahluwalia *et al.*, 2017).

Chaque type de LT activé et différencié par les cytokines de son microenvironnement s'engage dans une réponse spécifique. Les lymphocytes T Helper (Th) expriment le récepteur **CD4**, et sont divisés en plusieurs catégories. Les cellules **Th1** se mettent en jeu lors d'une infection de virus et de pathogène intracellulaires par exemple, en produisant de l'Interféron- γ (**IFN γ**) et du Tumor Necrosis-alpha (**TNF α**). Ces cytokines par la suite déclenchent une

signalisation dans les cellules voisines ; l'IFN γ et le TNF α augmentent l'activité phagocytaire des macrophages par exemple. Les cellules **Th2** sont plus spécialisées dans l'immunité humorale et l'infection par les vers parasites, recrutent les lymphocytes B, les éosinophiles et les mastocytes. Les cellules **Th17** s'activent entre autre en réponse à la présence de pathogènes extracellulaires. Ces cellules synthétisent de l'**IL-17A**, une cytokine pro-inflammatoire. Cette dernière agit notamment sur les cellules épithéliales, en ayant un effet protecteur sur la barrière afin de limiter l'entrée de pathogènes dans la muqueuse. Les **LT cytotoxiques**, exprimant les récepteurs **CD8**, jouent un rôle important contre les pathogènes intracellulaires induisant l'apoptose des cellules infectées grâce à la libération d'enzymes telles que les Perforines (créant des pores dans la membrane) et les Granzymes (clivant les protéines). Les LT cytotoxiques sécrètent également des cytokines, telles que l'IFN γ et le TNF α . Les **lymphocytes T régulateurs** (Treg) sont généralement considérés immunosuppresseurs, en sécrétant des molécules telles que l'**IL-10**, le *Transforming Growth Factor* β (**TGF- β**) et l'**IL-35**. Ces cellules ont un rôle fondamentale dans le maintien de l'homéostasie en prévenant une réponse inflammatoire excessive (Ahluwalia *et al.*, 2017).

Les **Lymphocytes B** sont induits principalement dans les plaques de Peyer, suite aux DCs et la sécrétion de TGF- β principalement, mais aussi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (Ahluwalia *et al.*, 2017). Cette induction les transforme en cellules plasmiques, qui sécrètent des **immunoglobulines A** (IgA). Les IgA sont des protéines présentes à la surface de la muqueuse, pouvant rencontrer toute molécule antigénique rapidement, l'enrobant d'un manteau IgA en empêchant le contact avec l'épithélium (Brown *et al.*, 2013). Pour gagner la lumière intestinale les IgA secrétées dans la muqueuse par les plasmocytes sont transportées à travers les cellules épithéliales intestinales à l'aide d'un récepteur spécifique (Brown *et al.*, 2013). De plus, le butyrate produit par les bactéries augmente la production d'IgA (Ohland and Jobin, 2015).

Les LT CD4⁺ et CD8⁺ et les LB ayant été activés par un antigène spécifique peuvent rester dans la lamina propria en tant que **cellules mémoires**, afin de réagir plus rapidement et efficacement lors de la prochaine présentation de cet antigène (Ahluwalia *et al.*, 2017).

Étant à l'interface avec le contenu de la lumière intestinale, il est important que le SI développe une tolérance afin d'empêcher le développement d'une réponse inflammatoire non adaptée contre le microbiote intestinal ou les antigènes alimentaires. Si cette tolérance est mal assurée, des pathologies telles que des intolérances alimentaires, la maladie cœliaque peut se mettre en place. Ce mécanisme inclut une absence de réponse de la part des LT appelée **anergie** et une inhibition de la réponse de la part des Treg. Pour les macrophages, cette anergie n'est

pas due à une absence d'expression des TLR, mais plutôt à une modulation de la signalisation suite à l'activation de ces récepteurs (Bain and Mowat, 2014).

Par ailleurs, les cellules épithéliales intestinales produisent des signaux immunorégulateurs comme la cytokine IL-10 ainsi que d'autres facteurs promouvant le développement de DCs et de macrophages tolérants. Ces DCs peuvent par la suite favoriser la différenciation des Treg (Ahluwalia *et al.*, 2017).

C. Le microbiote, élément clé dans l'intestin

1. Composition

Le tractus digestif héberge mille milliards de bactéries. Une étude parue en 2016 établit une nouvelle évaluation du nombre de cellules présentes dans le corps moyen d'un homme de 70kg avec en moyenne $3,8 \cdot 10^{13}$ bactéries pour $3 \cdot 10^{13}$ cellules humaines (Sender *et al.*, 2016). L'ensemble de ces micro-organismes possède trente fois plus de gènes que le génome humain (Shreiner *et al.*, 2015). Ces chiffres, bien que ne prenant pas en compte de nombreux paramètres, permettent de mettre en évidence l'importance fondamentale d'étudier l'impact de ces micro-organismes en physiologie humaine.

L'ensemble des micro-organismes présents dans l'intestin est appelé **Microbiote intestinal**. L'ensemble des génomes de ces micro-organismes se nomme Métagénome ou **Microbiome** (Turnbaugh *et al.*, 2007). Le microbiote est un véritable écosystème, parfois considéré comme un organe « caché » à part entière, et comprend de nombreuses espèces de bactéries, mais aussi des champignons, des archées, des virus eucaryotes et bactériens, les bactériophages. La colonisation du tube digestif commence dès la naissance et se stabilise vers l'âge de trois ans (Rinninella *et al.*, 2019). La composition du microbiote est influencée par de nombreux facteurs. Dès la naissance, la composition varie en fonction de la voie d'accouchement (voies basses vs césarienne), le type d'alimentation (lait maternel ou maternisé), l'environnement et le patrimoine génétique de l'hôte. D'autres facteurs surveillent ensuite tels que la prise d'antibiotiques, de médicaments, les polluants, le tabac... (Rinninella *et al.*, 2019).

Bien que de nombreux facteurs influencent sa composition, la **résilience** du microbiote est une caractéristique importante. La résilience est défini comme « la propriété d'un écosystème à maintenir son état et se rétablir d'une perturbation » (Dogra *et al.*, 2020). Cela permet de garder un équilibre homéostatique entre les communautés de micro-organismes mais aussi entre le microbiote et son hôte afin de prévenir l'apparition de troubles métaboliques ou de maladies chroniques. L'équilibre compositionnel du microbiote est dynamique afin de pouvoir faire face

à une perturbation comme lors de la prise d'antibiotiques, de changement de régime alimentaire ou la présence de micro-organismes exogènes (Lozupone *et al.*, 2012; Sommer *et al.*, 2017).

Les **bactéries** sont les micro-organismes les plus nombreux dans le microbiote. La composition du microbiote bactérien est variable dans le temps et dans l'espace. Durant les premières années de vies de l'Homme, la diversité du microbiote augmente et se stabilise vers l'âge de trois ans avec une majorité des phyla **Firmicutes** et **Bacteroidetes** (Rinninella *et al.*, 2019). Malgré le fait que l'intestin n'abrite que quelques phyla, la diversité est considérable à l'échelle taxonomique, avec de nombreuses espèces et souches différentes (Arora and Bäckhed, 2016). L'écosystème intestinal évolue le long du tube digestif, avec un environnement changeant, notamment dû à une diminution de la présence d'oxygène et une augmentation du pH (Figure 5). La richesse en micro-organismes augmente selon un axe proximo-distal : 10^3 bactéries/mL dans le jéjunum à un maximum de 10^{11} bactéries/mL dans le côlon (Sender *et al.*, 2016). Il existe également un gradient transversal selon un axe lumière-muqueuse ; les genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Ruminococcus* dominent dans la lumière tandis que *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Akkermansia* sont plus proches du mucus (Swidsinski, 2005).

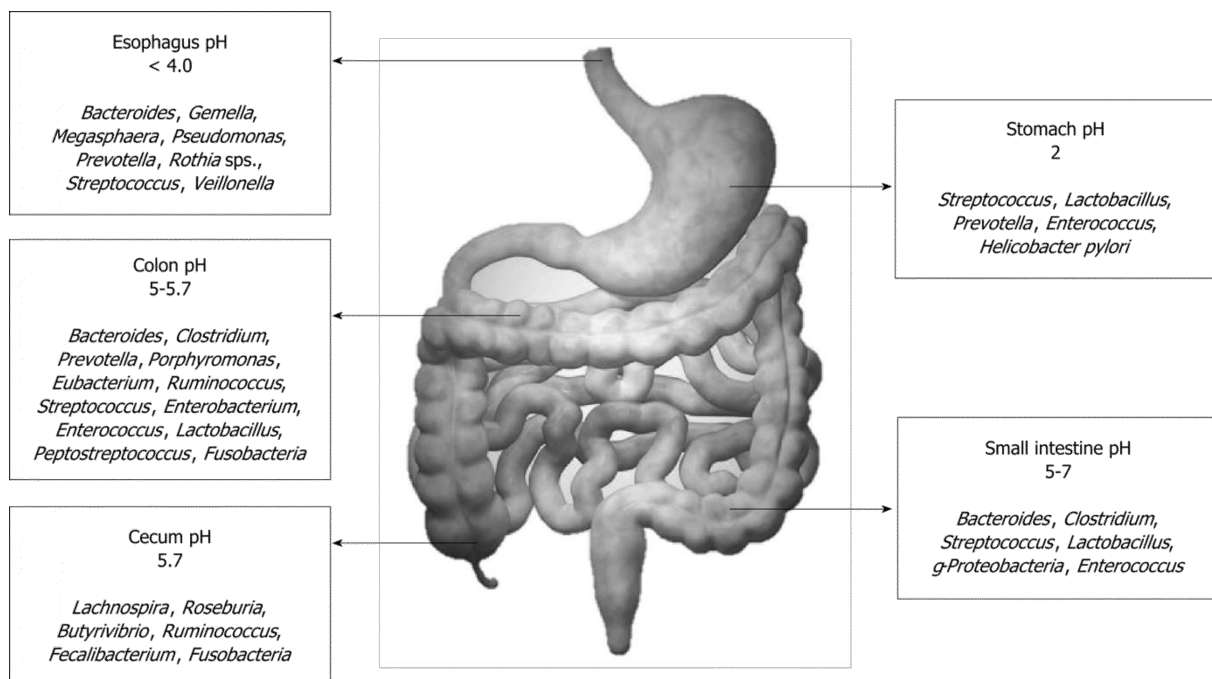


Figure 5 : Genre bactérien majoritaires et pH en fonction des segments de l'intestin.

La composition du microbiote varie le long du tube digestif, notamment en raison d'un gradient de pH et d'oxygène. d'après Jandhyala, 2015.

Deux vastes études européennes et américaines, *Metagenomics of Human Intestinal Tract (MetaHIT)* et *Human Microbiome Project (HMP)* respectivement, ont analysé la composition en micro-organismes ainsi que le répertoire génétique de vastes cohortes humaines (Figure 6). Ces données ont permis de démontrer que le nombre de gènes du microbiome intestinal était mille fois plus important que le génome humain (Arora and Bäckhed, 2016). L'analyse du métagénome démontre l'existence d'une grande **variation de microbiote entre populations et entre individus**, en lien avec l'indice de masse corporel mais aussi de facteurs extrinsèques comme la pratique sportive, l'ethnicité, les habitudes alimentaires et culturelles. Cependant, il est possible d'identifier un noyau commun à 50% des métagénomes analysés, composés d'une centaine d'espèces des phyla Bacteroidetes et Firmicutes (MetaHIT Consortium, 2010).

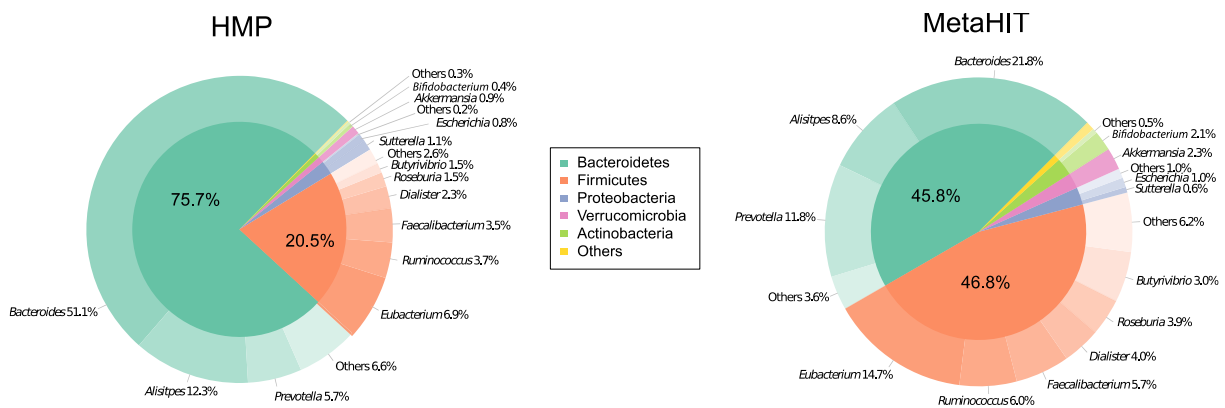


Figure 6 : Composition en bactéries du microbiote fécal humain décrits dans deux vastes études, Human Microbiome Project et Metagenomics of Human Intestinal Tract.

La composition du microbiote fécal humain varie selon différents facteurs environnementaux et génétiques. Les phyla Firmicutes et Bacteroidetes sont prédominants dans les deux études. *adapté de Arora and Bäckhed, 2016*

L'étude MetaHIT a mis en évidence la présence de trois **entérotypes** chez l'homme. Les entérotypes sont des clusters déterminés par l'abondance des bactéries et de leurs fonctions. L'entérotipe 1 possède une plus grande proportion de *Bacteroides*, l'entérotipe 2 est caractérisé par une abondance du genre *Prevotella* et l'entérotipe 3 est marqué par une grande richesse en *Ruminococcus* (MetaHIT Consortium, 2011).

La plupart des bactéries du microbiote sont des bactéries anaérobies, leur culture étant donc complexe. L'accroissement du nombre d'études sur la composition du microbiote a été rendue possible grâce au développement de techniques d'identification par séquençage à haut débit, notamment l'ADN ribosomal 16S, qui est ensuite comparé aux bases de données (Shreiner *et al.*, 2015). De nouvelles techniques sont développées, telles que le *shotgun sequencing*. Cela permet d'obtenir le séquençage du génome entier afin d'étudier non seulement la taxonomie, mais aussi le répertoire génétique (Barko *et al.*, 2018).

L'ensemble des champignons dans l'intestin, appelé le **Mycobiote**, constituent un sujet d'étude émergeant, notamment sur les interactions qu'il existe avec les bactéries. Malgré leur plus faible nombre par rapport aux bactéries, leur implication dans certaines pathologies est démontrée. L'étude du mycobiote impose le développement de nouvelles techniques (Richard and Sokol, 2019)

Le **Virome**, comprenant les virus à ADN et ARN de l'intestin, est une large population de micro-organismes, dix fois plus nombreux que les bactéries. A côté de rares virus eucaryotes (environ 5% du virome intestinal), le virome contient essentiellement des virus ayant pour cible cellulaire les bactéries, les bactériophages (**phageome**), et les archées. Les virus intestinaux sont une composante encore peu étudiée et le développement de nouveaux outils est en cours (Mukhopadhy *et al.*, 2019).

Les bactéries, champignons, virus et archées cohabitent depuis longtemps dans l'intestin, que ce soit les micro-organismes commensaux ou pathogènes. Des **interactions inter-règnes** se sont donc développées, le microbiote a influencé l'évolution de l'hôte et inversement. Chaque organisme a développé la capacité de reconnaître et de répondre aux molécules de son partenaire. L'hôte a un impact sur la composition du microbiote, par ses habitudes de vie par exemple comme il a été mentionnée plus haut, mais également par son patrimoine génétique (Bonder *et al.*, 2016).

2. Importance des fonctions du microbiote dans la physiologie

Au-delà de la composition du microbiote, c'est véritablement les fonctions symbiotiques qu'il possède qui sont importantes pour la physiologie de l'hôte (Figure 8). La métatranscriptomique, la métabolomique et la peptidomique sont des techniques permettant d'obtenir des informations sur les métabolites portant les fonctions exercées par le microbiote. Ces fonctions sont métaboliques, immunologiques et plus largement de protection de la barrière (Figure 8). Malgré les différences compositionnelles entre individus sains, il est intéressant d'observer que les fonctions assurées par le microbiote restent constantes dans une population (Figure 7) (The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Cela signifie que certains micro-organismes possèdent des fonctions similaires et sont substituables, et leur étude permettrait d'adopter une nouvelle approche lors de l'étude de dysbiose (déséquilibre du microbiote) compositionnelles et/ou fonctionnelles.

Le microbiote participe au métabolisme des glucides par fermentation, les transformant en **acides gras à chaîne courtes** (AGCC), comme le butyrate, le propionate ou l'acétate. Ces AGCC sont la source d'énergie principale des cellules épithéliales intestinales et certains ont des effets immunomodulateurs. Les *Bacteroides* sont les bactéries prédominantes dans la production des AGCC (Jandhyala, 2015). Les bactéries contribuent par ailleurs au métabolisme des protéines, en produisant notamment de l'acide γ -amino butyrique (**GABA**), un neurotransmetteur, à partir du glutamate. Les bactéries sont également sources de **vitamines** non synthétisées par l'organisme, telles que la vitamine K et certaines vitamines B (Jandhyala, 2015). Il a également été montré que le microbiote participe au métabolisme des **polyphénols** (Jandhyala, 2015)

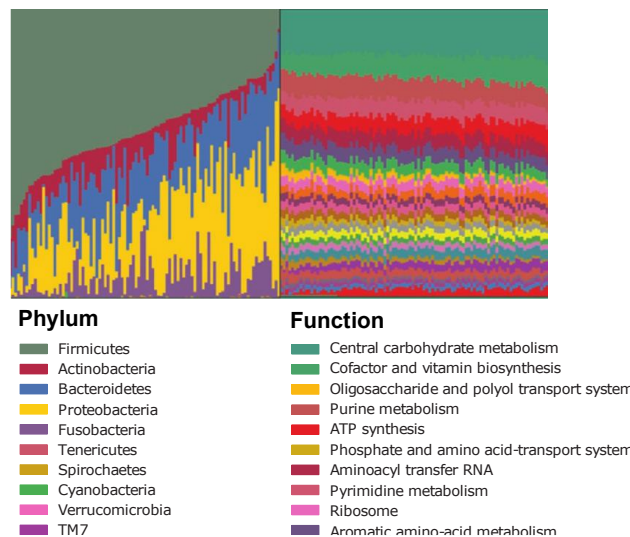


Figure 7 : Comparaison de la composition en bactéries du microbiote et des fonctions qu'il exerce
 Les fonctions du microbiote sont conservées malgré une composition en bactéries qui varie. Chaque barre représente un échantillon de donneur différent. *d'après The Human Microbiome Project Consortium, 2012.*

Une fonction primordiale du microbiote est sa capacité à **éduquer le système immunitaire** (Figure 8). Le microbiote, grâce aux PAMPs, permet la maturation du GALT et stimule l'induction des Treg, permettant de contrôler l'inflammation dans l'intestin en tolérant les micro-organismes commensaux tout en restant vigilant face aux pathogènes (Ohland and Jobin, 2015). Cette fonction est clairement illustrée chez les souris axéniques, dépourvues de microbiote. Ces souris présentent un GALT très peu développé, peu de patches de Peyer et de ganglions mésentériques lymphatiques, une production très faible d'anticorps comparé à des souris conventionnelles (Round and Mazmanian, 2009). Les souris axéniques possèdent une surface intestinale plus petite, le renouvellement de l'épithélium est plus lent, des villosités plus petites, une couche de mucus plus petite, un péristaltisme altéré (Jandhyala, 2015; Ohland and

Jobin, 2015). Lorsque ces souris sont colonisées par un microbiote commensal de souris saines, ces défauts sont restaurés (Lin and Zhang, 2017).

De plus, les animaux axéniques sont plus sensibles aux infections à des pathogènes comme le démontre une étude de 1961 sur des cochons d'Inde axéniques infectés par *Shigella flexneri* (Sprinz *et al.*, 1961). Les animaux sont moins résistants et la mortalité est plus élevée par rapport à des souris ayant un microbiote conventionnel.

Certaines bactéries jouent des rôles spécifiques sur la mise en place du système immunitaire. Par exemple, les bactéries filamenteuses segmentées (SFB), appartenant au genre *Clostridium* sont nécessaires pour la différenciation des Th17 dans la lamina propria (Ivanov *et al.*, 2008).

Le microbiote intestinal **renforce la barrière intestinale**, en maintenant par exemple les jonctions serrées par une signalisation impliquant les TLR2 (Jandhyala, 2015). Le butyrate mentionné plus haut peut stimuler la production de mucus (Lin and Zhang, 2017), mais est également capable d'induire l'expression du TGF β dans les cellules épithéliales intestinales (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2018).

Le microbiote possède également des **fonctions trophiques** (Figure 8). Il bio-transforme les **acides biliaires** primaires en acide biliaires secondaires par déconjugaison puis déshydroxylation et déshydrogénation. Ces acides biliaires peuvent avoir des effets immunomodulateurs. Les acides biliaires sont nécessaires à la digestion des lipides dans l'intestin, mais possèdent également un rôle de signalisation assimilable à une hormone endocrine (Joyce and Gahan, 2017).

Un métabolite important à l'interface entre l'hôte et le microbiote est le **tryptophane**. Le tryptophane est un acide aminé essentiel non synthétisé par l'homme, et apporté par certains aliments, comme les bananes, le fromage, le brocoli ou le chocolat. Le tryptophane est le précurseur de nombreux métabolites microbiens et humains. Il est métabolisable dans l'intestin selon trois voies. La première est la transformation directe du tryptophane par le microbiote en dérivés indoles, des ligands du récepteur d'aryl d'hydrocarbure (**AhR**). La signalisation via le récepteur AhR est considéré comme majeure dans la réponse immunitaire de la barrière intestinale et son homéostasie (Agus *et al.*, 2018). Ce récepteur est principalement activé par des métabolites bactériens, comme le montre une étude réalisées chez des souris axéniques, dépourvues de microbiote, qui ne possèdent que peu d'agonistes AhR (Lamas *et al.*, 2016). La deuxième est la transformation par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales intestinales grâce à l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et produit de la kynurénine

et ses dérivés, régulant divers processus comme l'inflammation, la neurotransmission et la réponse immunitaire (Agus *et al.*, 2018). La dernière voie est la production de sérotonine par les cellules entérochromaffines. La sérotonine est un neurotransmetteur du système nerveux. Dans l'intestin, elle est impliquée dans divers processus tels que le péristaltisme, la sécrétion, la vasodilatation et l'absorption des nutriments (Agus *et al.*, 2018).

Certaines bactéries spécifiques possèdent des propriétés anti-inflammatoires, c'est le cas par exemple de *Faecalibacterium prausnitzii*, qui produit un peptide anti-inflammatoire (Quévrain *et al.*, 2016). Des souches de bactéries ont été spécifiquement isolées et identifiées à partir du microbiote intestinal et sont envisagées comme probiotiques notamment pour les patients touchés par les MICI (Cuffaro *et al.*, 2021). C'est le cas par exemple de certaines souches de *Lactobacillus*, qui ont démontré de puissants effets anti-inflammatoires chez des souris modèle de colite, tout en induisant la différenciation des lymphocytes Treg (Fernandez *et al.*, 2011; Hrdý *et al.*, 2020). Certaines peptidoglycan de la paroi bactérienne de la souche *Lactobacillus salivarius* Ls33 sont spécifiquement capable d'induire ces effets (Fernandez *et al.*, 2011).

Au vu de toutes ces fonctions, conserver une symbiose entre l'hôte et le microbiote intestinal mais aussi sein même de l'écosystème intestinal est un objectif clé dans la préservation de l'homéostasie.

Toutes les composantes de l'écosystème intestinal – le microbiote, la barrière intestinale, le système immunitaire – coopèrent pour maintenir l'homéostasie intestinale. Ces éléments sont interdépendants et le déséquilibre de l'un peut entraîner l'altération de tout l'écosystème, comme c'est le cas lors de pathologies telles que les MICI.

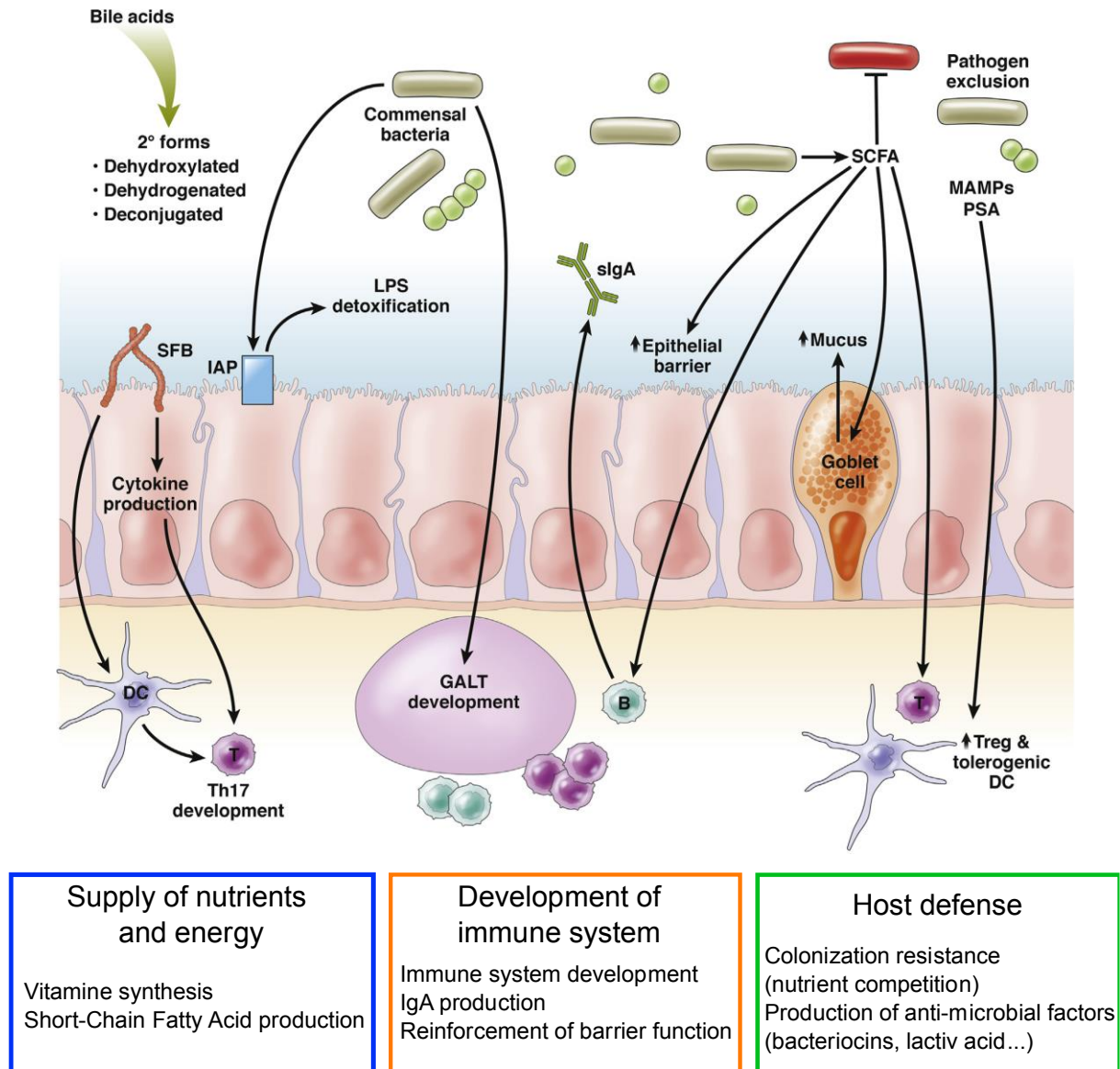


Figure 8 : Vue d'ensemble des différentes fonctions du microbiote et leur impact sur l'hôte

Le microbiote joue rôle essentiel sur le développement du système immunitaire, participe à la défense de l'hôte et produit des molécules nutritives et énergétiques pour les cellules eucaryotes de l'hôte. SFB : bactéries filamenteuses segmentées ; sIgA : immunoglobuline A sécrétoire ; SCFA : acide gras à chaîne courte ; MAMP : motif moléculaire associé aux microbes ; Treg : lymphocytes T régulateurs ; DC : cellule dendritique ; GALT : Tissu lymphoïde associé au tube digestif ; LPS : lipopolysaccharides ; IAP : phosphatase alcaline intestinale ; PSA : polysaccharides d'après Nishida et al., 2018 et Ohland and Jobin, 2015

II- Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

A. Physiopathologie des MICI

1. Considérations générales

Les MICI regroupent principalement la **Maladie de Crohn (MC)** et la **Rectocolite Hémorragique (RCH)**. Les MICI sont caractérisées par une inflammation de la paroi de l'intestin grêle et du côlon, liée à une hyperactivation du système immunitaire et à un défaut du microbiote intestinal. Ce sont des maladies « peu visibles » mais invalidantes du fait des symptômes et des douleurs chroniques liées à l'inflammation ; les MICI ont un fort impact sur la qualité de vie. Elles sont en général diagnostiquées entre 20 et 30 ans et sont caractérisées par des périodes de poussée entrecoupées de périodes de rémission. Ces maladies touchent les hommes et les femmes, et principalement les populations d'Europe et d'Amérique du Nord avec une prévalence de 0,5% (Tableau 2) (Kaplan and Jess, 2016). L'incidence de ces maladies est en train de se stabiliser en occident, tandis qu'elle est en augmentation dans les pays nouvellement industrialisés, même si la prévalence y reste plus faible (Windsor and Kaplan, 2019). Étant des maladies chroniques qui touchent des sujets jeunes, les MICI peuvent peser sur l'économie et les systèmes de santé des pays émergents et il semble donc indispensable de pouvoir mieux comprendre et traiter les MICI.

	Incidence moyenne pour 100 000 personnes par an		Prévalence moyenne pour 100 000 personnes par an	
	MC	RCH	MC	RCH
Amérique du Nord	15.05	15.95	207.4	213.05
Europe de l'Est	7.5	6.4	100.8	171.2
Europe du Nord	5.7	29.8	143	706.5
Europe du Sud	8.2	7.4	70.9	74.2
Europe de l'Ouest	6.2	9.6	175.1	227.6
Asie de l'Est	1.6	2.5	9.8	30.9
Asie du Sud-Est	0.3	0.4	4.4	6.7
Asie du Sud	1.9	3.4	1.2	24.8
Asie de l'Ouest	4.7	3.7	51.9	55.6
Amérique du Sud	1.75	3.5	21.2	24.5
Océanie	21.2	12.4	176.3	170.5
Afrique	5.9	3.3	19	10.6

Tableau 2 : Incidence et prévalence moyenne de la Maladie de Crohn (MC) et de la Rectocolite Hémorragique (RCH) dans le monde, entre 1990 et 2017

La prévalence est la plus élevée en Amérique du nord, en Europe et en Océanie. MC : Maladie de Crohn ; RCH : Rectocolite hémorragique. *d'après (Ng et al., 2017)*

Les symptômes des MICI sont principalement des diarrhées, des douleurs abdominales et des hématochézies (Geremia *et al.*, 2014). Par ailleurs, lors de la MC et de la RCH, il existe fréquemment des manifestations extra-intestinales pouvant atteindre les yeux, les articulations et la peau (Geremia *et al.*, 2014). Les MICI sont associées à un risque augmenté de cancer digestifs (colo-rectaux et grêlique) lié à la transition inflammation chronique-cancer (Geremia *et al.*, 2014).

La MC et la RCH présentent des localisations différentes dans le tube digestif, ainsi que des atteintes immunologiques et histologiques différentes.

La maladie de Crohn peut affecter tout le tube digestif, mais touche principalement l'iléon terminal, le côlon et/ou la région périanale (Cosnes *et al.*, 2011; Zhang, 2014). La MC présente une inflammation « en patch » discontinue, avec des lésions transmuraux (Schirmer *et al.*, 2019). Histologiquement, elle est caractérisée par des agrégats de macrophages et les lésions sont fréquemment retrouvées à proximité des plaques de Peyer (Schirmer *et al.*, 2019) formant des granulomes épithélioïdes et géantocellulaires caractéristiques mais présents dans seulement 30% des séries. Il est intéressant de noter que différents phénotypes de MC existent et que certains articles incitent à distinguer la MC colique et la MC iléale étant donné les différences épidémiologiques microbiologiques et génétiques entre ces deux phénotypes (Atreya and Siegmund, 2021). Cela permettrait d'avoir une approche thérapeutique plus ciblée et peut être plus efficace.

La RCH affecte quant à elle uniquement le côlon et le rectum en commençant par le rectum sous la forme d'une inflammation continue et initialement superficielle, affectant la muqueuse et la sous muqueuse (Cosnes *et al.*, 2011). D'un point de vue histologique, la RCH associe une inflammation chronique, des abcès cryptiques composés de neutrophiles, dans la lamina propria, et des déformations épithéliales des cryptes (Schirmer *et al.*, 2019). Il n'y a pas de granulome au cours de la RCH. Sur un plan génétique, la RCH pourrait se rapprocher de la maladie de Crohn colique ouvrant là encore des perspectives nouvelles de prise en charge.

Il n'existe pas de traitement curatif pour les MICI, la stratégie thérapeutique actuelle est constituée d'un contrôle de certains facteurs de risque (essentiellement le tabagisme pour la maladie de Crohn), de traitements médicamenteux immunosuppresseurs et de recours à la chirurgie d'exérèse souvent délabrante et n'empêchant pas les récurrences notamment dans la MC.

Lors d'une atteinte par les MICI, l'efficacité de la barrière intestinale est mise en défaut et la réponse inflammatoire est altérée (Matricon, 2010).

L'étiologie des MICI est mal connue, mais plusieurs facteurs ont été mis en évidence.

2. Facteurs génétiques

Des données démontrent la part modeste de la **composante génétique** des MICI reposant sur l'existence de formes familiales de ces maladies, un taux relativement élevé (< 50%) de concordance chez les jumeaux monozygotes et de fortes disparités géographiques dans l'incidence des MICI (Matricon, 2010).

Cent soixante-trois gènes de prédisposition génétique aux MICI ont été identifiés en analysant la totalité des génomes de patients (Ananthakrishnan, 2015). Ces gènes sont impliqués dans de nombreux processus tels que la reconnaissance des micro-organismes, l'activation des lymphocytes, la synthèse de glycoprotéines du mucus et de peptides anti-microbiens, la prolifération des cellules épithéliales intestinales... Trente de ces gènes sont plus spécifiquement associés à la MC, 23 à la RCH alors que 110 sont commun aux deux types de MICI (de Souza and Fiocchi, 2016).

Certains de ces *loci* ont fait l'objet d'études extensives. C'est le cas notamment de celui qui porte le risque relatif le plus élevé, le gène **NOD2** (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2*) qui code un récepteur pouvant détecter le Muramyl di-peptide (MDP) de la paroi des bactéries à Gram positif et négatif. Ce récepteur a donc un rôle clé dans la réponse immunitaire et sa régulation (de Souza and Fiocchi, 2016). Comme évoqué précédemment (Voir I-B.2.i.), NOD2 est activé le MDP du peptidoglycane, et résulte en une activation des MAPK et de la voie NF-κB, et de l'autophagie (Al Nabhani *et al.*, 2017). Une mutation de *NOD2* est associée au niveau cellulaire à une diminution de la synthèse d'IL-10, une cytokine régulatrice anti-inflammatoire, mais à un niveau plus écologique à une diminution des bactéries *Faecalibacterium*, ainsi qu'une augmentation des bactéries du genre *Escherichia* (Glassner *et al.*, 2020).

CARD9 est un autre *locus* associé aux MICI. Ce gène est exprimé par les macrophages et les DCs et code pour une protéine adaptatrice nécessaire à la transmission de signaux de reconnaissance de micro-organismes intestinaux. Les animaux invalidés pour *CARD9* présentent une immunité anormale, avec entre autres une diminution de la cytokine IL-22, impliquée dans la régénération du tissu, ainsi qu'une diminution du renouvellement des cellules épithéliales intestinales (Lamas *et al.*, 2016). Ces souris possèdent un défaut de métabolisme du tryptophane. Ces métabolites activent normalement un récepteur, le récepteur d'aryl d'hydrocarbure (AhR) qui régule la production d'IL-22. Les souris invalidées pour *CARD9* possèdent également un microbiote modifié, avec une diminution des souches capables de cataboliser le tryptophane (Lamas *et al.*, 2016). De plus, la production de ligand d'AhR est diminuée chez les patients atteints de MICI, en particulier lorsque les patients possèdent une

version mutée de *CARD9* (Lamas *et al.*, 2016). Ces données sont intéressantes car elles démontrent que le patrimoine génétique de l'hôte a un impact sur la composition du microbiote.

Cela suggère que la physiopathologie des MICI implique la génétique, le microbiote et la réponse immunitaire intestinale résultant de modifications écologiques. Dans ce contexte, des facteurs environnementaux pourraient venir perturber l'écosystème et participer à ce jeu à plusieurs bandes.

3. Facteurs environnementaux

Les facteurs génétiques ne sont donc pas les seuls à avoir un rôle dans la mise en place des MICI, ils agissent en synergie avec des facteurs environnementaux, qui ont été identifiés ces dernières quinze années. L'environnement peut avoir un impact à l'échelle du pays, de la communauté, de la famille ou à l'échelle individuelle. Identifier ces facteurs de risque est important car, contrairement aux facteurs génétiques, certains pourraient faire l'objet d'études d'intervention pour réduire ces risques de développer une MICI, mais aussi pour optimiser les traitements.

Les MICI étant fortement associées à l'homéostasie du microbiote, de nombreuses études ont étudié le lien avec la prise d'**antibiotiques**. Plusieurs méta-analyses démontrent un lien entre l'exposition des enfants aux antibiotiques et le risque de développer une maladie intestinale, avec une association plus forte pour la MC (Ananthakrishnan *et al.*, 2018).

Comme évoqué précédemment, le microbiote est influencé par l'environnement présent pendant l'enfance. Malgré l'influence du mode d'accouchement sur le microbiote, il n'a pas été démontré de lien entre développement d'une MICI et la naissance par césarienne ou voies basses. En revanche, de multiples publications ont démontré l'impact positif de l'**allaitement** maternel sur les MICI ; plus la durée d'allaitement est longue, plus la probabilité d'avoir une MICI est faible (Ananthakrishnan *et al.*, 2018).

A l'échelle de la population, la **pollution environnementale** entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale, mais les études sur les liens entre MICI et particules fines ne sont pas univoques. Certains auteurs démontrent d'une corrélation entre hautes concentrations en NO₂ et MC ainsi que hautes concentrations de SO₂ et RCH (Kaplan *et al.*, 2010) mais ces facteurs ne sont pas retrouvés pour toutes les tranches d'âges rendant complexe leur interprétation.

Le **régime alimentaire** a une influence majeure sur la composition du microbiote, il est donc naturel d'étudier l'impact de l'alimentation sur les MICI. Un régime riche en fibres semble diminuer la probabilité de développer la MC, tandis qu'un régime pauvre en fibre l'augmente.

L'exploration des effets des glucides et des protéines fournit des résultats plus hétérogènes (Ananthakrishnan *et al.*, 2018). L'augmentation de la consommation de produits alimentaires transformés entraîne l'augmentation de la consommation d'adjuvants alimentaires. L'impact négatif des **émulsifiants** sur la composition du microbiote et l'intestin a été démontré dans de multiples études. En modèle animal, ce microbiote pro-inflammatoire est associé à une altération dans l'expression génique et au développement d'une colite (Chassaing *et al.*, 2015, 2017; Viennois *et al.*, 2017).

Les facteurs de risque diffèrent selon la MC et la RCH ; par exemple la **tabagisme** est un facteur de risque pour la MC tandis que c'est un facteur protecteur pour la RCH (Neurath, 2014). C'est également le cas pour l'**appendicectomie**. Parmi les patients appendicectomisés pour appendicite aiguë avant 20 ans, il existe une plus faible incidence de la RCH, sans avoir d'impact clair sur la MC (Ananthakrishnan, 2015). Les mécanismes entre appendicectomie et RCH ne sont pas encore clairs. En revanche, un lien a été fait entre la présence de l'appendice caecal et une augmentation de la longévité chez les mammifères (Collard *et al.*, 2021). Plusieurs hypothèses pour expliquer ces observations sont évoquées par cette publication. Il est probable que ces observations soient liées à la capacité à l'appendice d'être un « réservoir » de bactéries commensales pouvant protéger contre les infections de pathogènes entériques, notamment *C. difficile* (Collard *et al.*, 2021). Par ailleurs, l'appendice caecal possède un GALT important, permettant de nombreuses interactions avec les micro-organismes que l'appendice abrite. Ainsi, des études permettant d'éclaircir la fonction de l'appendice caecal dans la symbiose hôte-microbiote seraient intéressantes.

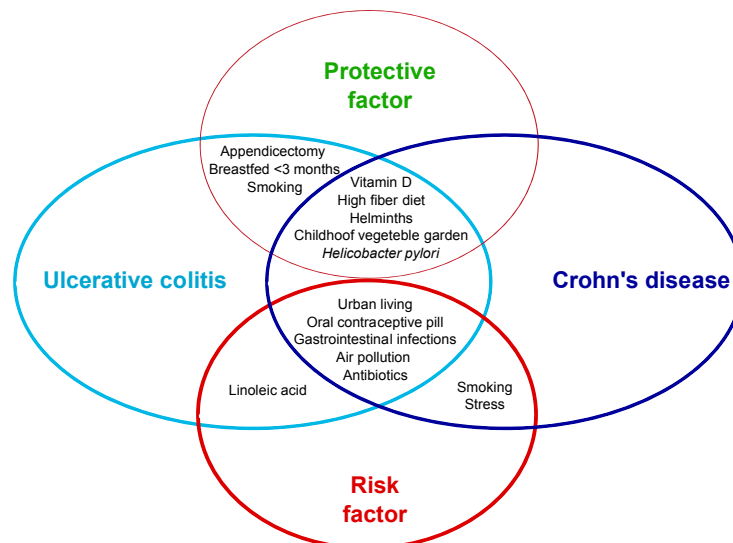


Figure 9 : Exemples de facteurs environnementaux ayant un impact sur le développement d'une maladie inflammatoire chronique intestinale

Ulcerative colitis : Rectocolite hémorragique ; Crohn's disease : Maladie de Crohn. *d'après Gearry, 2016.*

Cette liste de facteurs de risques n'est pas exhaustive. Il existe de nombreux articles démontrant des liens entre MICI et d'autres facteurs environnementaux avec des conclusions souvent contradictoires. L'étude de l'environnement reste éminemment complexe et fait intervenir de multiples biais. Néanmoins, parmi les facteurs de risque démontrés, beaucoup ont un impact sur le microbiote, ce qui ne fait que confirmer le rôle central de ce dernier dans la physiologie et le développement des MICI

B. Perturbations de la muqueuse lors des MICI

1. Réponse inflammatoire exacerbée

Les MICI sont caractérisées par une inflammation chronique et dérégulée de la muqueuse intestinale. Que ce soit lors de la MC ou de la RCH, il existe une activation générale de la réponse immunitaire locale via la sécrétion de cytokines par les premiers relais de l'immunité innée (cellules épithéliales, DCs, macrophages) qui va aboutir *in fine* à une réponse de type Th17. Plusieurs phénomènes interviennent avant l'enclenchement de cette réponse immunitaire.

Cytokine	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
Réponse de l'immunité innée		
IL-1 β	+	+
TNF α	++	+
IL-6	+	+
IL-8	+	+
IL-12	+	N
IL-18	+	+
IL-23	+	N
IL-27	+	N
Réponse des lymphocytes T		
IFN- γ	+	N
IL-5	N	+
IL-13	N	+
IL-17	+	N
IL-21	+	N

Tableau 3 : Sélection de cytokines dont la production est modulée lors des maladies inflammatoires chroniques intestinales. N : non modulé *d'après Sartor, 2006.*

Un des premiers signes d'inflammation est l'infiltration de la muqueuse intestinale par les **neutrophiles**, en particulier au cours de la RCH. La libération par les neutrophiles de ROS (*Reactive Oxygen Species*), sérine protéases, métalloprotéinases matricielles et de myéloperoxydase entraîne une érosion des cellules épithéliales et une altération de la barrière intestinale (Schoultz and Keita, 2019).

Les macrophages intestinaux, qui sont anergiques et ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires en conditions physiologiques, agissent différemment lors des MICI. Une étude rapporte que, chez les patients atteints de MC, les macrophages sécrètent abondamment des

cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-23, TNF α et induisent la synthèse d'IFN γ (Kamada *et al.*, 2008). Un autre article montre que les macrophages dérivés des monocytes du sang périphérique de patients MC sécrètent peu de TNF α après stimulation par la bactérie *E. coli* ou activation de TLR (Smith *et al.*, 2009). Ces résultats contradictoires démontrent que la réponse aiguë des macrophages est dérégulée lors de la MC et conduit à un défaut de défense de la muqueuse intestinale. Les DCs présentent également des défauts d'expression lors des MICI, avec une augmentation de l'expression des **TLR2 et TLR4**. Lors de la MC, elles expriment également plus de récepteur CD40 et produisent davantage **d'IL-12 et d'IL-6** (de Souza and Fiocchi, 2016).

Des études ont montré que certains loci de susceptibilité aux MICI contiennent des gènes codant pour des cytokines telles que l'**IL-10, l'IFN γ , l'IL-21** (Neurath, 2014). Par exemple, les souris invalidées pour le gène codant l'IL-10 développent spontanément une colite, avec infiltrats inflammatoires, lorsque l'intestin est au contact d'un microbiote (Kiesler *et al.*, 2015). Ces souris constituent un modèle murin fréquemment utilisés pour étudier les MICI (Kiesler *et al.*, 2015)

Des tentatives de traitement par des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou l'IFN β se sont révélées peu voire inefficaces (Neurath, 2014). En revanche, certaines stratégies thérapeutiques ciblent spécifiquement des cytokines pro-inflammatoires. C'est le cas notamment des **anticorps anti-TNF α** , sont largement utilisés, mais malheureusement perdent leur efficacité au cours du temps ou restent totalement inefficaces chez environ un tiers des patients (Maloy and Powrie, 2011). Des études chez la souris montrent que l'utilisation d'anticorps **anti-IL-6** améliore la colite, et ces résultats ont été confirmés dans un essai clinique avec des patients atteints de la MC (Maloy and Powrie, 2011). Cependant, ce type de thérapie entraîne des effets secondaires tels qu'il ne sont pas utilisés en pratique aux cours des MICI, avec notamment une augmentation du risque infectieux (Maloy and Powrie, 2011). La nécessité de développer des thérapies ciblant plus spécifiquement l'intestin reste cruciale pour la prise en charge de ces patients.

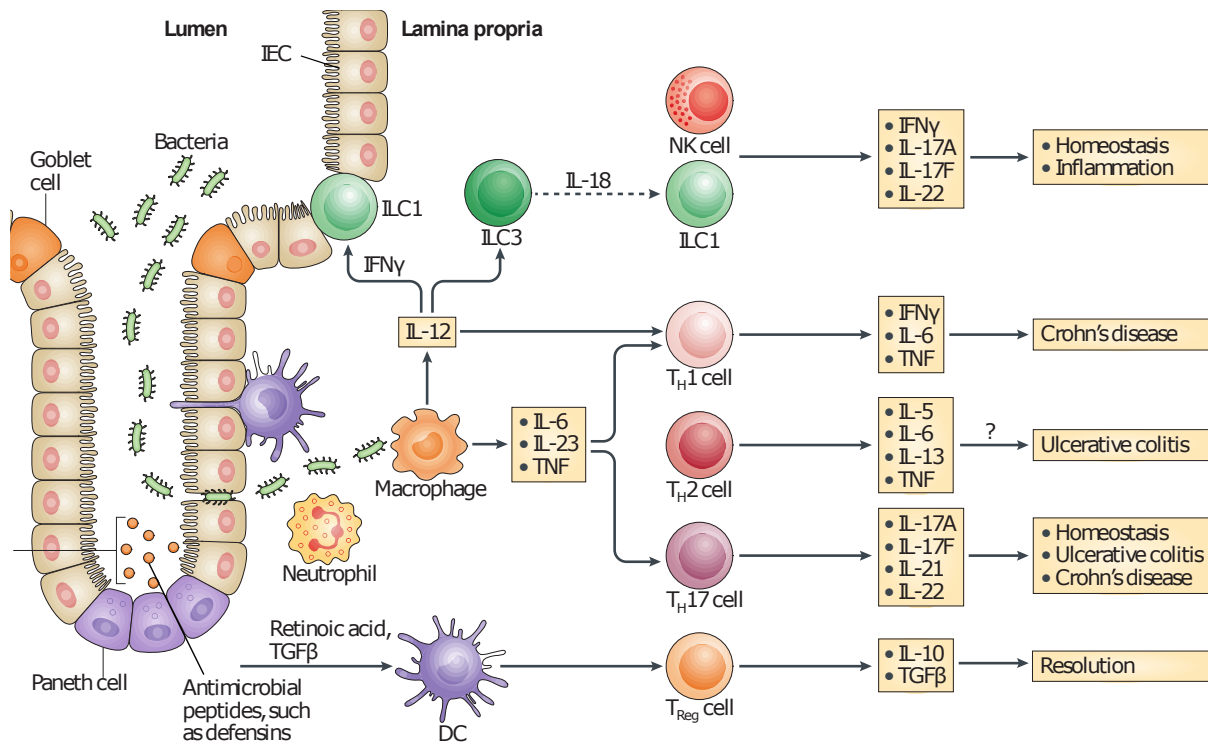


Figure 10 : Cytokines clés impliquées dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)

Lors des MICI, il y a une réponse inflammatoire disproportionnée, avec la synthèse de cytokines de la part de multiples cellules, notamment les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules épithéliales intestinales et les lymphocytes. Il y a un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires, telles que le $TNF\alpha$, et les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. ILC : cellules lymphoïdes innées ; IL-6 : interleukine-6 ; NK cell : Natural killer cells ; $IFN\gamma$: interféron- γ ; Th1 : lymphocytes Th1 ; DC : cellule dendritique ; $TGF\beta$: transforming growth factor- β . d'après Neurath, 2014.

La réponse inflammatoire adaptative semble différente selon qu'il s'agisse de la MC ou de la RCH. Les patients MC présentent plutôt une réponse Th1 et Th17 tandis que en cas de RCH, l'inflammation est de plutôt type Th2 (Ramos and Papadakis, 2019) (Tableau 4).

Lors de la MC, la réponse Th1 et Th17 est induite par la sécrétion d'IL-12, IL-18, IL-23 et $TGF\beta$ par les cellules présentatrices de l'antigène. Ce processus entraîne la sécrétion d'IL-17, d' $IFN\gamma$ et $TNF\alpha$, qui stimulent entre autres les macrophages, les DCs, entretenant une boucle positive de la réponse inflammatoire (Ramos and Papadakis, 2019). Des modèles murins invalidés pour les gènes IL-12p40 et IL-23 sont résistants à l'induction de colite, démontrant l'implication centrale de ces cytokines (Ramos and Papadakis, 2019). Des stratégies visant ces cytokines ont abouti au développement de médicaments efficaces dans les MICI. Là encore, les résultats ne sont pas généralisables à tous les patients.

L'implication des Treg dans les MICI est moins claire, cependant il a été observé dans la muqueuse des patients RCH et MC **un nombre plus faible de Treg** en période de poussée (Schoultz and Keita, 2019). L'expansion des Treg par certaines stratégies (IL-2 faible dose par exemple) est en cours d'étude dans les MICI (Allegretti *et al.*, 2021).

Au niveau intra-cellulaire, plusieurs altérations liées aux MICI ont été décrites.

La voie de signalisation Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (**NF- κ B**) est une voie centrale dans l'inflammation. Brièvement, pour activer sa signalisation, il existe deux voies, la voie classique ou la voie alternative (Figure 11). La voie classique est activée par des stimuli différents tels que le LPS, l'IL-1 β , le TNF α ... résultant en l'activation du complexe I κ B kinase (IKK), pouvant lui-même phosphoryler I κ B qui séquestre dans le cytoplasme RelA, le facteur de transcription. Libéré de son complexe inhibiteur, RelA peut ensuite transloquer dans le noyau (Atreya *et al.*, 2008).

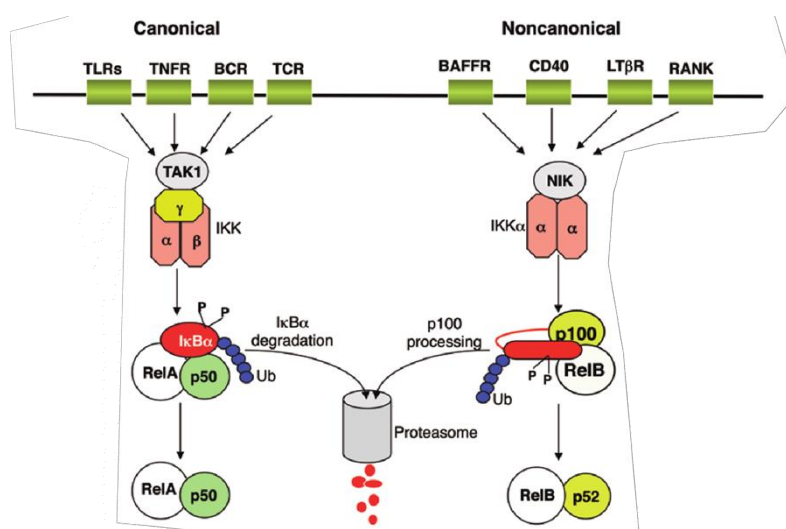


Figure 11 : Activation de la voie canonique et non-canonique NF- κ B

L'activation de la voie NF- κ B dépend de plusieurs récepteurs qui active la phosphorylation du complexe IKK puis par cascade la phosphorylation de I κ B α qui sera dégradé permettant au complexe facteur de transcription RelA/p50 de transloquer dans le noyau. LA voie non canonique repose sur un système similaire, avec la phosphorylation de la protéine p100 qui permet au facteur de transcription RelB/p52 de transloquer au noyau.

TLR : Toll-Like Receptors ; TNFR : TNF récepteur ; B-TCR : récepteur

des lymphocytes B / T ; IKK : I κ B kinase ; BAFFR : récepteur BAFF ; LT β R : récepteur de la lymphotoxine β
D'après Sun *et al.*, 2011.

Des souris génétiquement modifiées de façon à bloquer l'activation de cette voie de signalisation développent spontanément une colite inflammatoire dans le côlon (Nenci *et al.*, 2007). En absence de voie NF- κ B fonctionnelle, le renouvellement des entérocytes est diminué, il y a une diminution de la sécrétion de peptides antimicrobiens, résultant en l'altération de la fonction de barrière intestinale (Nenci *et al.*, 2007). Parallèlement, il a été démontré que les macrophages et les cellules épithéliales intestinales de patients MICI possèdent une augmentation de l'expression de Rel-A et une augmentation de l'activation de la voie NF- κ B (Atreya *et al.*, 2008). De plus, la voie NF- κ B est responsable de la synthèse accrue de cytokines pro-inflammatoire dans ces macrophages. Il est intéressant de noter que le TNF α peut à son tour activer la voie NF- κ B, créant un rétro-contrôle positif (Atreya *et al.*, 2008). Autant l'implication de cette voie est claire pour les macrophages, autant des résultats contradictoires sont rapportés sur la voie NF- κ B dans les cellules épithéliales au cours des MICI. Le rôle pro-

inflammatoire de cette voie a déjà été démontré dans de nombreux articles, mais il existe également des preuves de sa fonction anti-inflammatoire. Par exemple, des souris invalidées spécifiquement dans les cellules épithéliales pour NEMO, qui fait partie du complexe IKK (Figure 13), développent spontanément une colite due à une altération de la barrière intestinale (Nenci *et al.*, 2007) tandis que des souris invalidées pour IKK β présentent une augmentation de la réponse inflammatoire avec une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (Zaph *et al.*, 2007). Ces études démontrent de l'importance de NF- κ B dans l'homéostasie cellulaire et intestinale.

L'**autophagie** est un autre processus cellulaire dérégulé dans la MC, avec deux variants alléliques *ATG16L1* et *IRGM* qui augmentent la prédisposition à la maladie (Garrett *et al.*, 2010). Des études ont démontré l'importance de l'autophagie dans les cellules de Paneth. Que ce soit sur des modèles murins ou chez l'humain, une mutation de *ATG16L1* et *NOD2* entraîne des cellules de Paneth non fonctionnelles, diminuant leur capacités bactéricides (Ramos and Papadakis, 2019). De plus, dans les DCs, une mutation de ces gènes entraîne une incapacité à présenter un antigène aux lymphocytes T (Ramos and Papadakis, 2019).

Le **stress du réticulum endoplasmique** (RE) des cellules épithéliales est également impliqué dans les MICI. Le stress du RE est activé suite à l'*unfolded protein response* (UPR), qui est déclenchée par l'accumulation de protéines mal repliées. Parmi les protéines nécessaires à l'UPR, *Inositol-Requiring Enzyme 1* (IRE1) et *Xbox Binding Protein 1* (XBP1) sont les plus conservées à travers l'évolution (Kaser *et al.*, 2010). La mutation de l'un ou l'autre de ces gènes chez la souris résulte en une susceptibilité accrue à une colite induite par le Dextran-Sodium Sulfate (DSS), ainsi qu'un stress du RE augmenté (Kaser *et al.*, 2008, 2010). Au niveau cellulaire, la déplétion de XBP1 augmente l'apoptose des cellules de Paneth, une diminution des cellules à mucus et une augmentation de la réaction des cellules épithéliales intestinales au TNF α (Kaser *et al.*, 2008). Cette même équipe a par ailleurs pu démontrer une association du locus XBP1 avec la MC et la RCH (Kaser *et al.*, 2008). La muqueuse non-enflammée de patient RCH présente un stress du RE plus élevé que les patients contrôles, ce qui pourrait expliquer une plus grande sensibilité à un stress du microbiote et à une réponse inflammatoire exacerbée (Tréton *et al.*, 2011).

L'implication de l'**inflammasome** dans les MICI a récemment été mise en évidence. En effet, l'inflammasome est impliqué dans la synthèse d'IL-1 β et d'IL-18, deux cytokines majeures dans la physiopathologie des MICI. De plus, le loci de *NLRP3*, gène codant une

protéine impliquée dans l'activation de l'inflammasome, a été associé aux MICI (Maloy and Powrie, 2011).

Il est intéressant de noter que les **DAMPs** et PAMPs peuvent jouer un rôle dans l'inflammation chronique lors des périodes de poussée des MICI. Le concept a été développé par Nathan et Ding : un stimulus cause l'inflammation, qui provoque des lésions tissulaires, libérant les DAMPs, exacerbant l'inflammation qui entraîne une libération de DAMPs, entretenant un cycle d'inflammation chronique typique des MICI (Nathan and Ding, 2010).

2. Altération de la barrière intestinale

A l'interface entre le microbiote et le compartiment interne de l'hôte, la barrière intestinale est impliquée dans la physiopathologie des MICI. La dysbiose du microbiote mais aussi l'inflammation exacerbée influencent directement la capacité de l'épithélium à maintenir une barrière fonctionnelle. L'augmentation de la perméabilité intestinale au cours des MICI est une composante de la maladie connue depuis de nombreuses années (de Souza and Fiocchi, 2016). L'importance de la barrière intestinale dans la pathogénèse de la MC a été démontrée par plusieurs études mettant en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale chez les parents au premier degré de patients MICI (Ramos and Papadakis, 2019).

Les différents acteurs de la barrière intestinale sont perturbés au cours des MICI (Figure 12). D'une part la barrière immunologique est dérégulée, comme évoqué dans le paragraphe précédent, mais aussi la couche de mucus, la barrière chimique et les jonctions intercellulaires.

i. Altération de la couche de mucus

La présence de la couche de mucus est importante afin de séparer la barrière des micro-organismes. Un article a démontré, chez des modèles murins et chez l'homme atteint de la RCH, qu'une diminution de l'épaisseur ou de la composition de la couche de mucus entraîne un contact direct entre les bactéries et l'épithélium (Johansson *et al.*, 2014). Cette perméabilisation du mucus peut en partie être expliquée par une diminution du nombre de cellules à mucus observée chez les patients atteints de RCH (Michielan and D'Inca, 2015). Le mucus est altéré d'un point de vue quantitatif mais aussi qualitatif ; les mucines sont moins nombreuses et glycosylées et la phosphatidylcholine est diminuée (Michielan and D'Inca, 2015).

MUC2 est la principale glycoprotéine du mucus intestinal. Sa présence est critique dans la physiologie de la barrière. Une étude a démontré que lorsqu'une colite est induite chimiquement par DSS, les souris déficientes pour le gène *Muc2* présentent une inflammation plus importante et une maladie aggravée par rapport à des souris sauvages (Van der Sluis *et al.*, 2006).

MUC1, MUC2, MUC3 et MUC4 voient leur ARNm diminués au cours de la MC (Buisine *et al.*, 1999; Wibowo *et al.*, 2019).

ii. Altération de la barrière chimique

L'altération de l'autophagie comme évoqué précédemment entraîne une diminution des capacités fonctionnelles des cellules de Paneth (Ramos and Papadakis, 2019). Lorsque *XBPI*, gène codant une protéine de l'autophagie et associé aux MICI, est muté, le taux de lysozyme est diminué, ainsi que le nombre de cellules de Paneth (Garrett *et al.*, 2010). Ces altérations observées sur les cellules de Paneth chez les patients MICI affectent leur capacité à sécréter des peptides anti-microbiens.

Les patients atteints de MC produisent moins d' α - et β -défensines (Schroeder *et al.*, 2011; Wehkamp *et al.*, 2002). L'insuffisance en α -défensines est encore plus marquée chez les patients MC ayant une mutation *NOD2* (de Souza and Focchi, 2016).

La sécrétion de la lectine RegIII γ est dépendante du microbiote. Lors d'une dysbiose, RegIII γ voit donc son expression altérée (Schoultz and Keita, 2019).

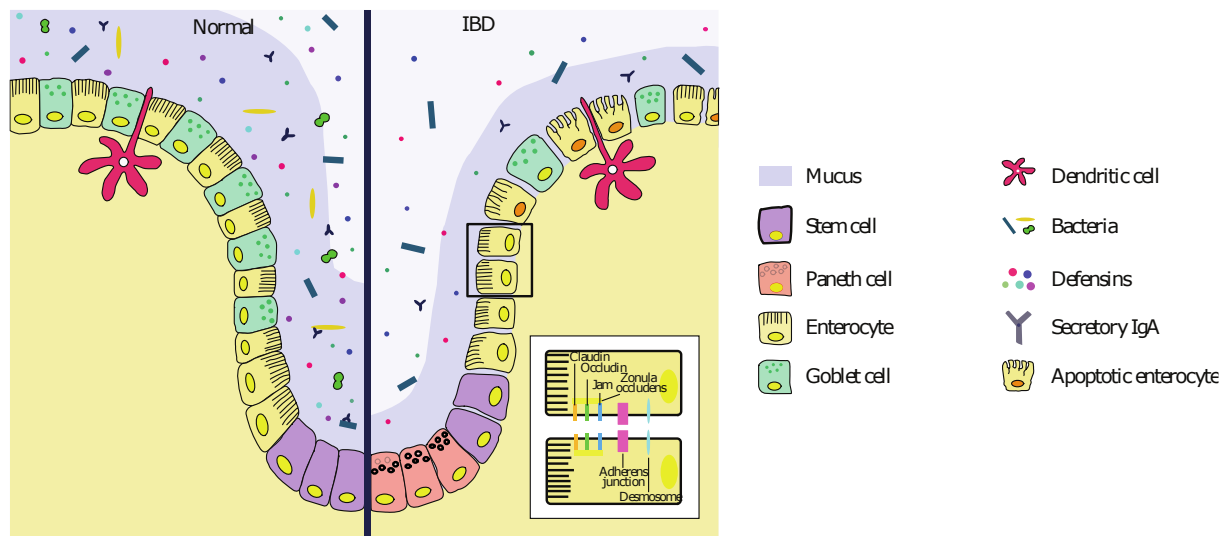


Figure 12 : Comparaison de la barrière intestinale à l'état sain (à gauche) et lors d'une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) (à droite), d'après (Michielan and D'Inca, 2015). La barrière est altérée en cas de MICI, avec une diminution de la barrière chimique (diminution du mucus, des peptides anti-microbiens), les protéines des jonctions sont perturbées ce qui résulte en une augmentation de la perméabilité aux macromolécules et aux ions.

iii. Altération des jonctions intercellulaires

Certaines cytokines, telles que l'IFN γ et le TNF α , sont connues pour déstabiliser les jonctions serrées de la barrière intestinale mais aussi rénale et pulmonaire (Turner, 2009). L'impact du TNF α sur la barrière intestinale a été largement étudié, du fait de l'implication de

cette cytokine dans la physiopathologie des MICI. Comme évoqué précédemment, les anti-TNF sont des molécules très utilisées en thérapeutique dans le cadre de la MC, ce qui permet de réguler l'inflammation mais permet également de corriger les perturbations de la barrière (Suenart *et al.*, 2002).

Lors des MICI, plusieurs études rapportent que les protéines des complexes des **jonctions intercellulaires** voient leur expression diminuer et sont **relocalisées**, comme l'occludine, la tricelluline, ZO-1, certaines claudines et JAM-A (Bhat *et al.*, 2019).

La dynamique des jonctions repose sur l'association des protéines qui composent le complexe jonctionnel ; en réponse à différents signaux, la phosphorylation et l'ubiquitination de ces protéines régule leur stabilité ou leur turn-over à la membrane (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008). La stabilité des complexes jonctionnels dépend également de leur association avec le cytosquelette d'actine (Voir I-B.1.iii.). La contractilité de la ceinture d'actomyosine est contrôlée par l'activité de deux kinases : la Myosin light chain kinase (**MLCK**) et la Rho-associated protein kinase (**ROCK**). Chez les patients MICI, la MLCK présente une augmentation d'activité, notamment dans le côlon, ce qui entraîne une internalisation des protéines de jonctions serrées, ce processus pouvant être à l'origine d'une hyperperméabilité intestinale (Blair *et al.*, 2006).

Le *locus* du gène codant la E-cadhérine (*CDH1*) a été associé aux MICI, ce qui démontre de l'implication de tout le complexe jonctionnel apical et pas seulement des jonctions serrées dans les MICI (Consortium, 2009). De plus, la E-cadhérine et la caténine p120 ont une expression diminuée chez les patients atteints de RCH (Zhang *et al.*, 2015).

Une étude publiée en 2018 a montré que la **tricelluline**, protéine des jonctions serrées tricellulaires, est diminuée chez les patients RCH mais pas chez les patients MC (Krug *et al.*, 2018).

La **claudine-2** semble lié à la pathogénèse des MICI. Son expression relative augmente au cours de la MC et de la RCH (Bhat *et al.*, 2019). La claudine-2 est impliquée dans le transport d'ions dans l'intestin et une augmentation de son expression entraîne une augmentation de la perméabilité à certains ions. Cependant, de façon paradoxale, les souris invalidées pour l'expression de la claudine-2 sont plus susceptibles à une colite induite par le DSS (Ahmad *et al.*, 2017). Une hypothèse formulée par Ahmad *et al.* est que l'expression augmentée de la claudine-2 chez les patients MICI est un processus d'adaptation permettant de compenser la diminution d'expression d'autres protéines de jonction. De futures études doivent être menées pour étudier le rôle de cette protéine.

C. La dysbiose au cours des MICI

1. Définition

La **dysbiose** est définie comme un déséquilibre du microbiote, tant dans sa composition que ses fonctions, menant à une perte de l'homéostasie intestinale (Hooks and O'Malley, 2017). La dysbiose s'oppose à la **normobiose** (ou eubiose), état d'équilibre et d'absence de pathologie. Une dysbiose associée aux MICI a été décrite et semble maintenant être une caractéristique de ces maladies (Halfvarson *et al.*, 2017). Dans la suite de cette thèse et pour plus de simplicité, la dysbiose associée aux MICI sera dénommée dysbiose.

Il est parfois difficile de corréler MICI et changements de micro-organismes « signatures », à cause de variations interindividuelles telles que le patrimoine génétique ou l'entérotype. Ce sont donc plutôt des **changements de profils compositionnels et fonctionnels** qui témoignent d'une dysbiose.

Une question clef dans la pathogénèse des MICI est l'ordre séquentiel des événements. Est-ce la dysbiose qui entraîne une inflammation exacerbée, elle-même influençant la composition en micro-organismes ? Comme décrit précédemment, la génétique de l'hôte influence la composition du microbiote, par exemple avec des variants de *NOD2*. L'émergence d'une MICI demeure une énigme à résoudre.

2. Dysbiose compositionnelle

Les différences compositionnelles du microbiote au cours des MICI sont très variables d'un travail à un autre. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes plus intéressés aux aspects fonctionnels qu'aux aspects compositionnels. Néanmoins, voici les grandes lignes de cette dysbiose compositionnelle. La dysbiose est caractérisée par une forte diminution de la biodiversité, entraînant le développement d'espèces bactériennes aux dépens d'autres. La proportion de **Firmicutes** est diminuée tandis que le phylum des **Entérobactéries** est en expansion (Tableau 3) (Maloy and Powrie, 2011; Seksik, 2003). Concernant les Bacteroidetes et Protéobactéries, des publications rapportent à la fois des augmentations et des diminutions de ces phyla (Nishida *et al.*, 2018).

Le phylum des Firmicutes est particulièrement diminué dans le microbiote de patients ayant une MC, (Figure 13) (Manichanh *et al.*, 2012). La proportion d'Entérobactéries augmente, notamment les souches *E. coli* qui possèdent des propriétés d'invasion de la muqueuse intestinale, les ***E.coli* adhérent-invasifs** (AIEC). Ces derniers peuvent adhérer aux plaques de Peyer de l'iléon grâce aux cellules M, survivre et se répliquer dans les macrophages

de la muqueuse (Chassaing *et al.*, 2011; Glasser *et al.*, 2001). Il a été démontré que la présence des AIEC est détectée chez 21% des patients MC en période de poussée, comparé à 6% chez les sujets sains (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

Lors d'une RCH, il a été rapporté une augmentation des bactéries dites « agressives », telles que les *Desulfovibrio*, des bactéries impliquées dans le métabolisme du soufre (Manichanh *et al.*, 2012).

Certaines caractéristiques de la dysbiose sont communes à la MC et la RCH. Par exemple, on observe dans les 2 maladies une diminution des micro-organismes protecteurs *Faecalibacterium prausnitzii* (Manichanh *et al.*, 2012). Il est également observé une diminution de la stabilité dans le temps des espèces dominantes comparé à des individus sains (Manichanh *et al.*, 2012).

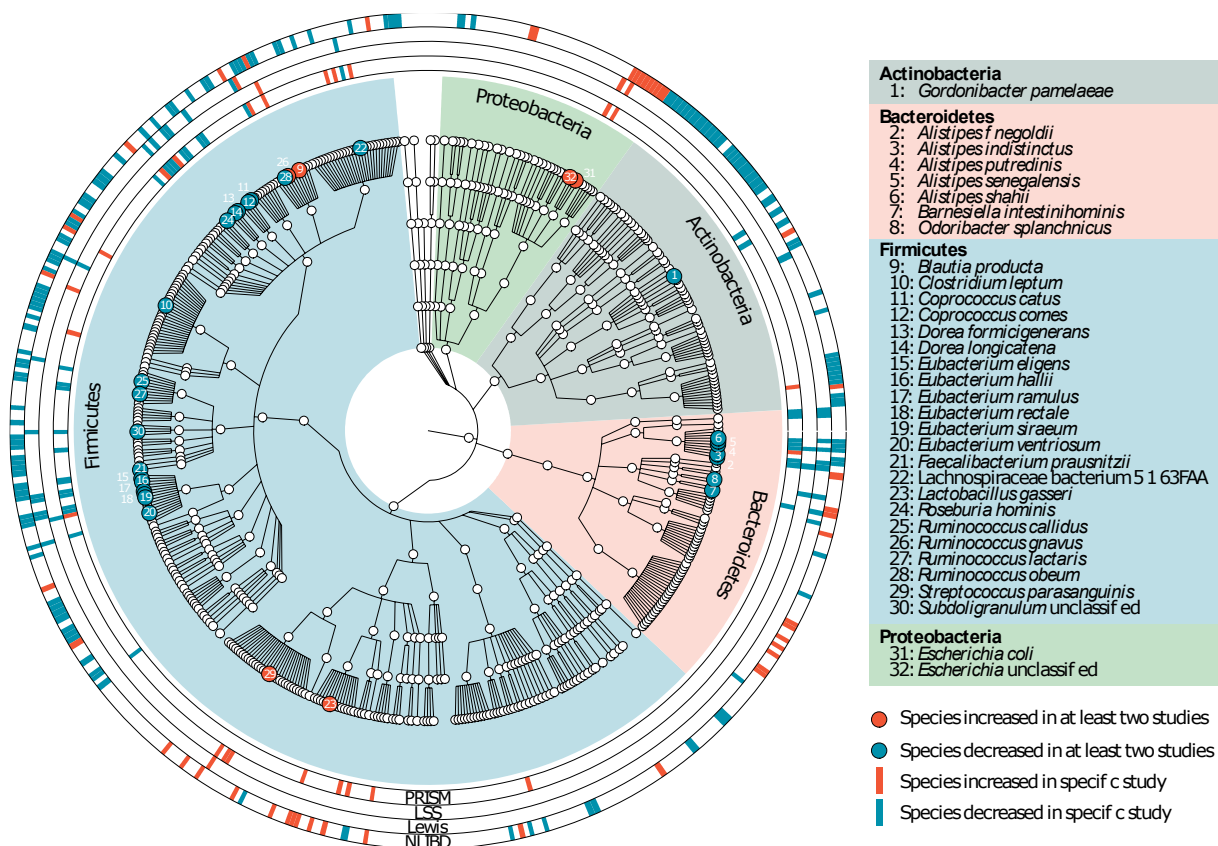


Figure 13 : Arbre phylogénétique des espèces bactériennes associées aux maladies inflammatoires chroniques intestinales

Résumé de l'intégration des données de multiples études métagénomiques permettant de mettre en évidence des tendances communes aux articles publiés. Le nom des études est indiqué en bas de la figure, dans les cercles extérieurs. d'après Schirmer *et al.*, 2019

Un déséquilibre du mycobiome a récemment été mis en évidence dans la physiopathologie des MICI. Tout comme les bactéries, une étude sur les fèces de patient MC démontre une diminution de la diversité des champignons, et une augmentation des levures du genre *Candida* comparé à des sujets sains (Tableau 3) (Richard and Sokol, 2019).

La composition en bactériophages a été démontrée comme plus haute chez les patients MICI par analyse métagénomique, avec notamment une augmentation des *Caudovirales* (Norman *et al.*, 2015; Zuo *et al.*, 2019). Cependant, dû au fait que les bases de données ne sont pas complètes étant donné qu'une minorité des phages intestinaux ont été identifiés, environ 15% (Norman *et al.*, 2015), ces données sont potentiellement biaisées. Par une approche bioinformatique indépendante des bases de données, il a été démontré que le noyau stable de bactériophages évolue vers des communautés moins stables et qui reflètent les changements en population bactériennes chez les patients MICI (Clooney *et al.*, 2019).

	Augmentation	Diminution
Bactéries	<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
	Pasturellaceae	<i>Bifidobacterium</i> spp.
	Proteobactérie (AIEC)	<i>Clostridium IV et XIVa</i>
	<i>Ruminococcus gnavus</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
	Veillonellaceae	<i>Roseburia</i>
		<i>Suterella</i>
Champignons	<i>Candida albicans</i>	
	<i>Candida tropicalis</i>	
	<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
Virus	Caudivirales	

Tableau 4 : Dysbiose compositionnelle au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin d'après Glassner *et al.*, 2020. AIEC : *Escherichia coli* adhérent-invasif.

3. Dysbiose fonctionnelle

Les changements quantitatifs décrits ci-dessus s'accompagnent de modifications qualitatives entraînant notamment une perte de fonctions symbiotiques. Il semble que ces anomalies fonctionnelles soient essentielles dans le développement d'une MICI.

Récemment, une vaste étude « multi-omics » a confirmé les pertes de fonctions démontrées dans les études précédentes tout en mettant en évidence l'implication de métabolites microbiens jusqu'alors non décrits (Franzosa *et al.*, 2019). Cette équipe a également pu mettre en évidence une perte générale de « diversité métabolique » dans le microbiote de patients MICI, corrélant

bien avec la diminution de la diversité compositionnelle (Franzosa *et al.*, 2019). Ce travail démontre l'importance de prendre en compte les **fonctions et métabolites dérivés** lors de l'étude du microbiote dans un contexte pathologique.

Le profil des **acides biliaires** est modulé. Dans les fèces des patients atteints de MICI, il y a une diminution des acides biliaires secondaires, une augmentation des acides biliaires conjugués et des acides biliaires sulfatés (Duboc *et al.*, 2013). Ces changements de composition en acides biliaires peuvent être expliqués par le changement de composition en bactéries, et donc les enzymes bactériens impliqués dans le métabolisme des sels biliaires. En effet, des souris axéniques, donc sans microbiote intestinal, possèdent un profil d'acides biliaires fécaux similaires à celui des patients MICI (Duboc *et al.*, 2013). Or, les acides biliaires secondaires possèdent des propriétés anti-inflammatoires sur la lignée de cellule épithéliale intestinale Caco-2, ce qui n'est pas le cas des acides biliaires sulfatés (Duboc *et al.*, 2013). Ces résultats sont cohérents dans le contexte des MICI, avec une diminution des acides biliaires aux propriétés anti-inflammatoires.

Au cours des MICI, les **AGCC** sont diminués, comme le montrent les études de métabolomique. En effet, les bactéries productrices de butyrate du genre *Bacteroidetes* et *Clostridium* sont diminuées, dont *F. prausnitzii* (Glassner *et al.*, 2020). La diminution de concentration en AGCC diminue leur capacité à activer les Treg et le renouvellement des cellules épithéliales intestinales, favorisant une inflammation exacerbée.

F. prausnitzii, comme évoqué précédemment, est fortement diminuée en cas de MC. De plus, la diminution de la présence de cette bactérie dans les selles a été montrée comme prédictive de rechute pour les patient en rémission (Sokol *et al.*, 2008). *F. prausnitzii* synthétise une petite protéine *microbial anti-inflammatory molecule* (MAM), possédant un pouvoir anti-inflammatoire sur les cellules épithéliales en bloquant la voie cellulaire NF- κ B (Quévrain *et al.*, 2016).

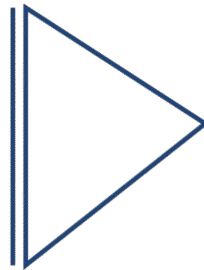
D'autres métabolites voient leur équilibre modifié au cours d'une MICI. C'est le cas des **sphingolipides**, qui sont fortement augmentés au cours de la MC (Franzosa *et al.*, 2019). *Bacteroides fragilis* est connu pour synthétiser des sphingolipides. Or, cette bactérie est diminuée chez les patients atteints de la RCH (Glassner *et al.*, 2020).

Ruminococcus gnavus et *Ruminococcus torques* sont deux espèces bactériennes augmentées lors des MICI. Ces sont des bactéries dites « **mucohydrolitiques** », elles dégradent les

mucines du mucus, le rendant moins épais. Cela perturbe la barrière intestinale et augmente donc potentiellement l'inflammation (Nishida *et al.*, 2018).

Dysbiose lors des MICI

- Réduction de la diversité du microbiote (diminution des Firmicutes)
- Diminution des bactéries productrices d'AGCC (*Clostridium* groupe IV, XIVa, XVII et *Faecalibacterium prausnitzii*)
- Augmentation des bactéries mucolytiques (*Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torques*)
- Augmentation des bactéries réductrices du sulfate (*Desulfovibrio*)
- Augmentation des bactéries pathogènes (*E. coli* adhérents-invasifs)



Impact sur l'intégrité de la muqueuse et l'immunité de l'hôte

- Diminution de la source d'énergie pour la prolifération et différenciation des cellules épithéliales
- Altération de la différenciation des lymphocytes T
- Dégradation du mucus
- Augmentation de l'invasion bactérienne
- Augmentation de l'altération des cellules épithéliales
- Induction de l'inflammation de la muqueuse
- Altération de la perméabilité de la barrière

Figure 14 : Dysbiose lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et impact sur l'hôte, d'après Nishida *et al.*, 2018.

Le métabolisme du **tryptophane** est perturbé lors des MICI. Il a été montré que la production d'agonistes AhR était diminuée en cas de MICI avec par ailleurs une diminution d'expression du récepteur comparé aux sujets sains. Chez la souris, un défaut en AhR augmente la sévérité d'une colite, qu'elle soit induite chimiquement par DSS ou par transfert de lymphocytes T naïfs. Chez ces souris, la production d'IL-22, cytokine impliquée dans la protection de la barrière intestinale et la lutte contre les pathogènes, est altérée (Zelante *et al.*, 2013). De même chez les cellules mononuclées isolées de la lamina propria, l'activation de AhR par son agoniste Ficz (6-formylindolo(3, 2-b)carbazole ; un dérivé du tryptophane) réduit la production d'IFN γ et augmente la sécrétion d'IL-22 dans la *lamina propria* (Monteleone *et al.*, 2011).

Le changement d'équilibre du microbiote observé chez les patients touchés de MICI ont donc un impact sur l'hôte, certains de ces effets sont résumés dans la figure 14.

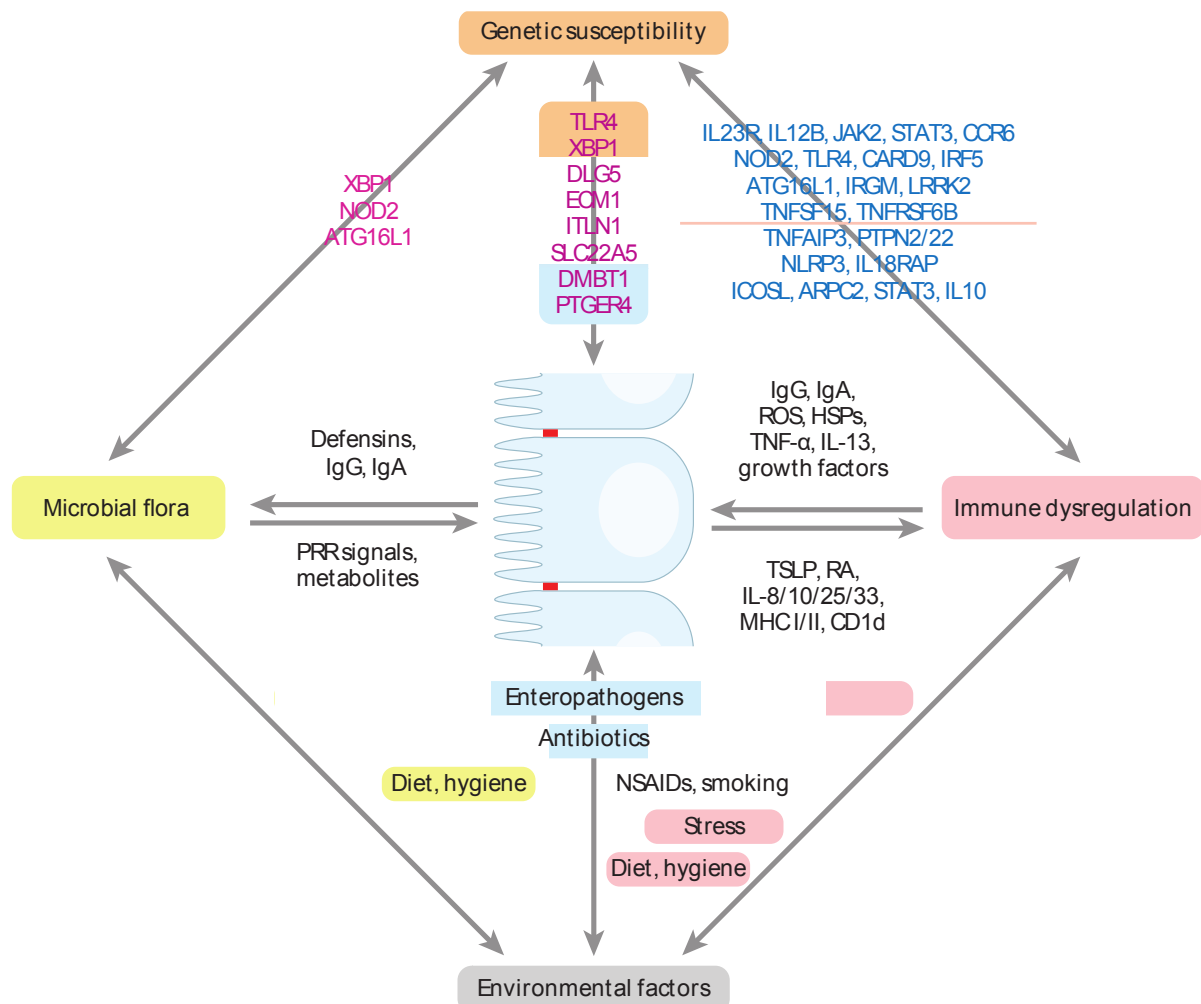


Figure 15 : Facteurs impliqués dans la mise en place des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) d'après Kaser et al., 2010. L'éthiologie des MICI n'a pas encore été mise en évidence de façon claire. La mise en place de la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique est multifactorielle : le microbiote, les facteurs environnementaux, le dérèglement de la réponse immunitaire de l'hôte et des susceptibilités génétiques de l'hôte. Comme démontré sur la figure, ces facteurs sont interdépendants et doivent être intégrés pour mieux comprendre le développement de ces maladies intestinales. Les facteurs spécifiques à la maladie de Crohn sont en magenta, ceux liés à la rectocolite hémorragique en bleu, les facteurs communs aux deux maladies sont en noir.

Il est nécessaire d'intégrer ces différents paramètres (le microbiote, la réponse inflammatoire, la barrière intestinale, le dialogue microbiote-hôte) afin de pouvoir comprendre la pathogénèse des MICI (Figure 15). Au cours de ces maladies, de nombreuses dérégulations sont décrites (Figure 16), dont une inflammation incontrôlée, un dysfonctionnement de la fonction de barrière, une perturbation des populations des micro-organismes du microbiote, accompagnée d'une dysbiose fonctionnelle.

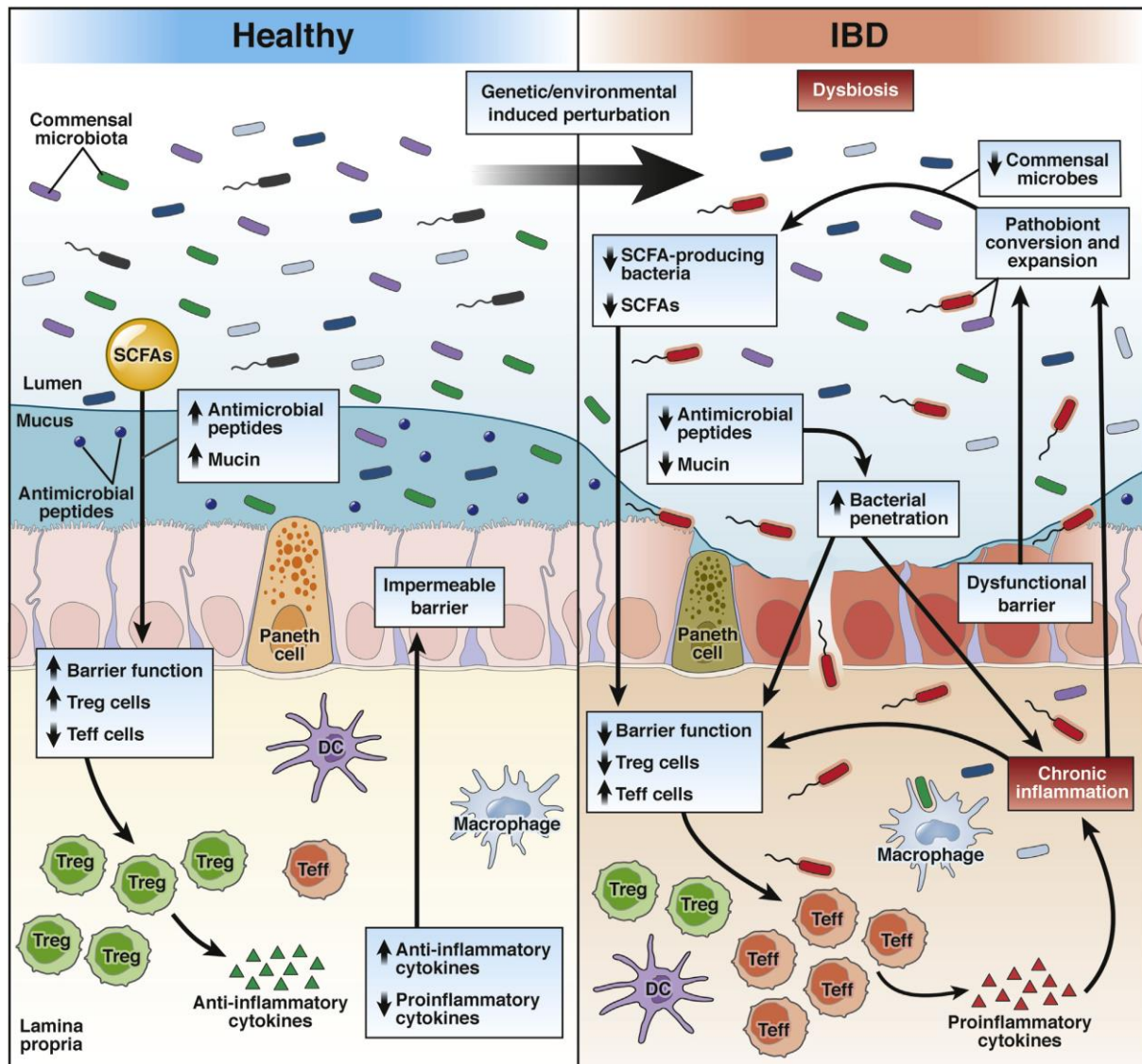


Figure 16 : Comparaison des changements dans l'intestin d'un sujet sain (panneau de gauche) vs patient IBD (panneau de droite) d'après Lee et Chang, 2021. Chez les patients MICI (droite) les populations de micro-organismes sont modifiées par rapport aux sujets sains (gauche). La production d'acides gras à chaîne courte (SCFA) est diminuée avec également une diminution des peptides anti-microbiens et une altération de la couche de mucus, résultant en une fonction de barrière intestinale affaiblie. La diminution des SCFA et donc de leurs effets bénéfiques entraîne une diminution de l'induction des lymphocytes T régulateurs (Treg) et une augmentation des lymphocytes T effecteurs (Teff). Ce déséquilibre entre Treg et Teff résulte en une inflammation exacerbée avec une production de cytokines pro-inflammatoires et une inflammation chronique, entretenant une barrière intestinale dysfonctionnelle. La dysbiose, le déséquilibre de la réponse inflammatoire et l'altération de la barrière intestinale mène à la mise en place d'une maladie inflammatoire chronique.

III- Le Quorum Sensing

A. Quorum Sensing : le réseau social des bactéries

Les métazoaires possèdent des modes de communications entre tissus, organes, cellules tels que les cytokines, les hormones ou encore les neurotransmetteurs. C'est également le cas des bactéries qui ne sont pas des cellules vivant indépendamment les unes des autres. Afin de se développer et de survivre dans un environnement complexe, les procaryotes possèdent un système de communication appelé Quorum Sensing.

1. Mécanisme général du Quorum Sensing

i. Découverte du Quorum Sensing chez *Vibrio fisheri*

Le Quorum Sensing (QS) est un mode de **communication** inter-bactérien reposant sur la diffusion dans l'environnement local de petites molécules dites « auto-inductrices ». Ces molécules, à partir d'une concentration seuil sont reconnues par les bactéries voisines et déclenchent l'expression de différents gènes de façon synchronisée (Figure 17).

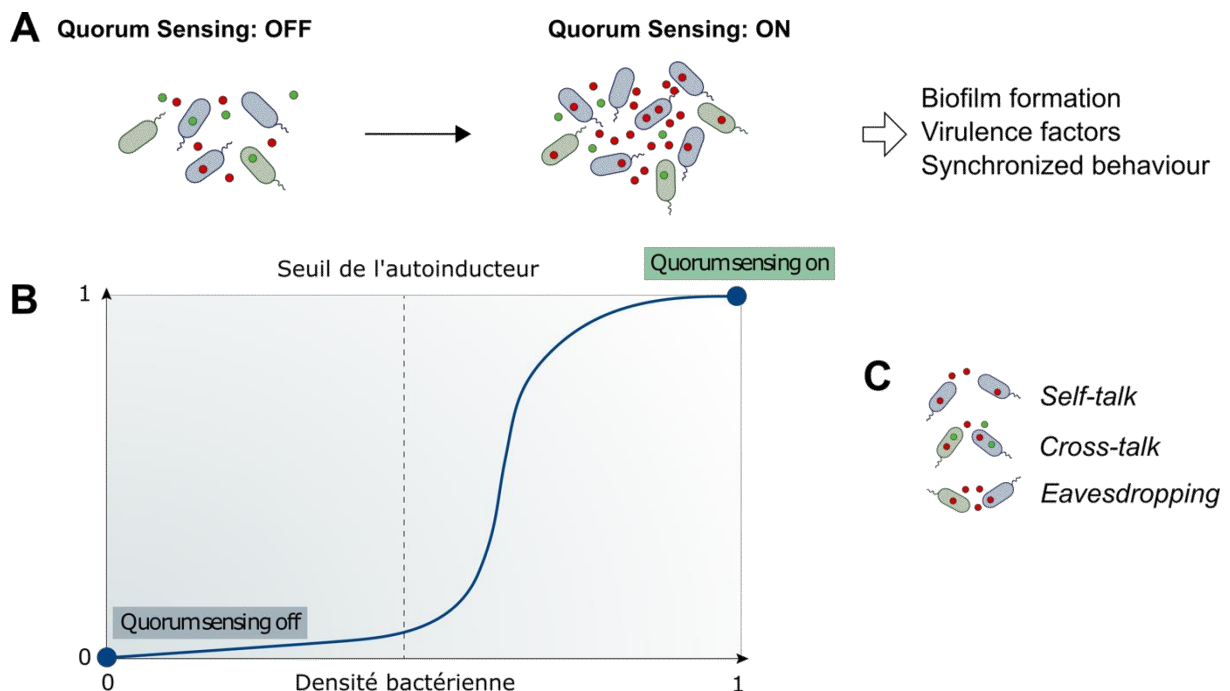


Figure 17 : Mécanisme d'activation du Quorum Sensing

A et B : à faible densité bactérienne, le Quorum Sensing (QS) n'est pas activé. Les bactéries synthétisent des molécules auto-inductrices (AI) dont la concentration est proportionnelle au nombre de bactéries. Lorsque la population (« Quorum ») augmente, la production d'AI est plus importante, et à partir d'un certain seuil, le QS est activé, déclenchant un comportement de groupe avec l'expression de certains gènes impliqués dans notamment la virulence. **C :** différents modes de communication existent au sein du Quorum Sensing. *Adapté de Mukherjee and Bassler, 2019 et Coquant et al, 2021*

L'histoire de l'étude du QS débute en 1970, après la parution du premier article sur l'auto-induction de la luminescence par *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970). *V. fischeri* est une bactérie marine qui n'émet pas de bioluminescence lorsqu'elle est à faible concentration dans l'océan. En revanche, elle vit en symbiose avec des organismes eucaryotes marins, lui permettant de vivre dans un environnement riche en nutriments et la population de *Vibrio fischeri* devient alors lumineuse. Parmi les animaux colonisés, le calamar *Euprymna scolopes* est l'organisme modèle pour étudier la relation entre l'hôte et *V. fischeri* qui occupe son organe luminescent (Norsworthy and Visick, 2013).

Nealson *et al.* ont alors remarqué que l'expression de la luciférase était proportionnelle à la quantité de cellules présentes dans le milieu ainsi qu'à la présence d'arginine. La même équipe, quelques années plus tard, a émis l'hypothèse de l'existence d'**une molécule dite auto-inductrice** (AI), qui s'accumule dans le milieu (Nealson and Hastings, 1979). En 1981, la molécule AI est extraite et analysée à partir de bactéries Gram négatif et est nommée AI-1 (Eberhard *et al.*, 1981). La molécule identifiée est une **N-Acyl-Homosérine Lactone (AHL)**. Le gène codant pour l'enzyme principale de la biosynthèse des AHLs est identifié peu de temps après (Engebrecht and Silverman, 1984; Engebrecht *et al.*, 1983). Ce n'est qu'en 1994 que le terme **Quorum Sensing** a été utilisé pour la première fois, afin d'introduire l'idée d'une population minimale (*Quorum*) nécessaire pour déclencher un comportement de groupe suite à un signal (Fuqua *et al.*, 1994).

ii. Auto-inducteurs et bactéries

Le QS fait donc intervenir de petites molécules AI synthétisées par les bactéries et qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportées. La quantité d'AI présente dans le milieu est donc proportionnelle au nombre de bactéries. A partir d'une certaine concentration, l'expression de gènes est activée et entraîne différentes réponses cellulaires (Figure 17) (Mion *et al.*, 2019). Parmi les gènes activés, on peut citer les gènes liés à la sécrétion de **toxines** (facteurs de virulence, molécules antimicrobiennes), des **protéases**, des composants de **biofilms** (enzymes de synthèse des polysaccharides extracellulaires) (Schuster *et al.*, 2013). La synthèse de ces éléments peut être énergétiquement coûteuse à l'échelle individuelle, mais bénéfique pour la survie de la population bactérienne et sa *fitness*.

Plusieurs systèmes de QS se sont développés au cours de l'évolution, avec des molécules de différentes natures, présentant des stabilités et propriétés différentes ainsi que des récepteurs spécifiques, permettant aux bactéries de percevoir au mieux les signaux, de survivre et se multiplier (Tableau 5) (Cornforth *et al.*, 2014). C'est le cas par exemple de la bactérie opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* qui possède quatre systèmes de QS qui sont interconnectés et hiérarchisés, avec un système dominant les autres.

L'étude du QS, la **socio-microbiologie** comme la dénomme Peter Greenberg (Parsek *et al.*, 2005), est une science récente, mais dont l'étude est propice aux problématiques scientifiques actuelles (Schuster *et al.*, 2013). La première raison est l'utilité de contrôler le développement bactérien, que ce soit pour des problématiques agroalimentaires mais aussi pour combattre la résistance aux antibiotiques. Par ailleurs, l'étude du QS permet d'étudier un système de coopération entre individus au sein d'une même population et de l'impact de pression de sélection. Les bactéries possèdent un taux de renouvellement rapide et la manipulation génétique de ces micro-organismes est maintenant bien maîtrisée, permettant d'apporter des réponses à des questions d'évolution.

Plusieurs moyens de communication à travers le QS existent (Figure 17C) (Prescott and Decho, 2020) :

- Le **self-talk** permet à une bactérie et celles de son espèce de produire et de reconnaître sa propre molécule de signal, ce qui permet également une régulation d'expression génique.
- Le **crosstalk** permettant à des bactéries de différentes espèces de communiquer entre elles.
- Le **eavesdropping** est la capacité d'une espèce bactérienne A d'intercepter le signal d'une espèce bactérienne B mais sans produire elle-même un signal

Avoir la capacité « d'écouter » les autres espèces bactériennes semble *a priori* indispensable dans des écosystèmes complexes tels que l'intestin, où des centaines de bactéries différentes cohabitent. Pourtant, nous verrons plus loin (Voir III-B.1.) que le QS a été encore peu étudié dans l'écosystème intestinal.

Par ailleurs, contrairement à l'idée d'une activation homogène du QS dans une population, des études récentes ont démontré le caractère stochastique du QS. La moitié du Quorum peut avoir un QS activé tandis que l'autre moitié non. Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas encore connus et ces processus nécessitent une étude plus approfondie (Mukherjee and Bassler, 2019a).

Récemment, il a été montré que les **bactériophages** de *Vibrio cholerae* possèdent un récepteur pouvant détecter l'AI de la bactérie et décider de l'orientation vers un cycle lytique ou lysogénique du phage (Silpe and Bassler, 2019).

2. Les différents QS

Les différents AI connus ne sont pas employés par toutes les bactéries, il est possible de différencier les molécules du QS utilisées par les bactéries Gram positif et Gram négatif. Il existe une troisième catégorie AI-2, dite « universelle » permettant une communication inter-espèces.

i. Quorum Sensing des Bactéries à Gram négatif

Comme évoqué plus haut, le premier système de QS décrit est celui de *V. fisheri*, qui est une bactérie à Gram négatif. Il utilise un système qui est à ce jour le plus étudié et considéré comme le plus commun, reposant sur les **N-Acyl-Homosérine Lactones** (AHLs), de type AI-1. La synthèse des AHLs repose sur le système **LuxI/LuxR** de *V. fisheri* : l'AHL est synthétisée par la protéine synthase LuxI à partir de la S-adénosyl-méthionine (SAM) et d'un Acyl Carrier Protein et l'AHL diffuse librement dans le milieu extracellulaire (Figure 18). L'AHL peut ensuite diffuser à travers la membrane ou dans la bactérie l'ayant synthétisée). Elle est alors reconnue par son récepteur intracellulaire LuxR, qui possède deux domaines : un domaine amino-terminal de liaison à l'AHL et un domaine de liaison à l'ADN carboxy-terminal (Papenfort and Bassler, 2016). L'interaction entraîne une homodimérisation de LuxR, qui lui permet de se lier à la **lux box** sur le promoteur cible (Abisado *et al.*, 2018). Très souvent LuxR induit l'expression du gène de synthase *LuxI*, ce qui crée un rétro-contrôle positif et augmente la concentration en AHL (Abisado *et al.*, 2018).

Chez certaines bactéries, LuxR est synthétisé mais ne possède pas son partenaire LuxI ; le récepteur est alors qualifié d'« orphelin » ou « solo » (Smith *et al.*, 2011) et est appelé **SdiA**, c'est le cas de 76% des homologues LuxR (Hudaiberdiev *et al.*, 2015). Par exemple la bactérie *Escherichia coli* possède le récepteur homologue LuxR mais pas de LuxI (Tobias *et al.*, 2020).

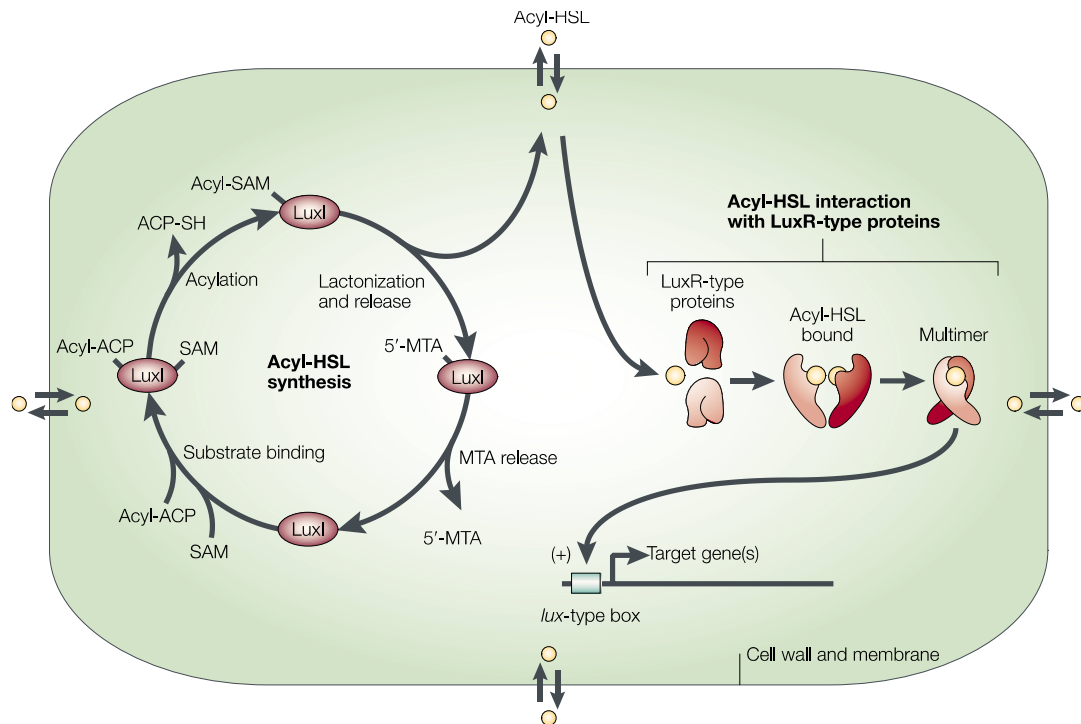


Figure 18 : Modèle de la synthèse et reconnaissance des AHLs dans une bactérie

Les AHLs sont synthétisées par LuxI à partir d'une S-AdenosylMéthionine (SAM) et la longueur de la chaîne varie en fonction de l'Acyl Carrier Protein (ACP). L'AHL peut diffuser librement à l'extérieur de la bactérie. Lorsqu'elle diffuse vers l'intérieur de la bactérie, elle est reconnue par LuxR, qui se dimérise et cible la *Lux*-box sur l'ADN, permettant l'expression de gènes. *adapté de Fuqua and Greenberg, 2002.*

Les AHLs sont constituées d'un noyau lactone relié par un lien amide à une chaîne carbonée (Tableau 5). Il existe une grande diversité d'AHLs parmi les bactéries mais aussi au sein d'une même espèce bactérienne. La chaîne carbonée est constituée de 4 à 18 carbones, en général en nombre pair ; la longueur de la chaîne a un impact sur la stabilité de la molécule, ce qui peut affecter la signalisation (Papenfort and Bassler, 2016). Le troisième carbone peut être oxydé (groupement cétone « oxo » avec une double liaison liée à un carbone), posséder un groupement hydroxyle (groupement « OH ») ou être réduit (Fuqua and Greenberg, 2002; Papenfort and Bassler, 2016). Certaines AHLs possèdent également une insaturation sur la chaîne carbonée (Fuqua and Greenberg, 2002; Ziesche *et al.*, 2019).

Le système QS de la Protéobactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un des plus étudié et des mieux décrits. *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste, les patients les plus vulnérables étant les personnes immunodéprimées et les personnes souffrant de mucoviscidose. Cette bactérie est responsable de nombreuses infections nosocomiales, notamment à cause de sa résistance à de nombreux antibiotiques.

P. aeruginosa possède cinq systèmes QS imbriqués et hiérarchisés, lui permettant d'intégrer les différents signaux de l'environnement. Deux des systèmes sont canoniques et reposent sur le principe LuxI/LuxR : LasI/LasR avec une N-(3-Oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (**3-oxo-C12-HSL**) et RhII/RhlR avec une N-butanoyl-L-homosérine lactone (**C4-HSL**). Le troisième système de QS est le Pseudomonas Quinolone Signal (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone ; **PQS**) ; la synthase PqsABCDH synthétise l'AI et PqsR le reconnaît (Figure 19) (Papenfort and Bassler, 2016). Le dernier système QS a été découvert plus récemment, en 2013, et a été nommé l'*Integrated Quorum Sensing (IQS)* (Lee *et al.*, 2013). L'IQS est activé notamment en cas de privation de phosphate (Lee *et al.*, 2013). Enfin, la molécule AI (2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde) est synthétisée par l'enzyme AmBCDE et son récepteur n'a pour l'instant pas été identifié (Lee *et al.*, 2013).

Les systèmes de QS chez *P. aeruginosa* sont astucieux et hautement interconnectés (Figure 19). La hiérarchie repose sur LasR situé en haut de la pyramide. Dans une boucle de rétro-contrôle positif, LasR, RhlR et pqsR activent leur système de synthase, respectivement LasI, RhII et PqsABCDH (Flèches rouge sur la figure 19) (Papenfort and Bassler, 2016). LasR active le système RhII/RhlR et le système PQS. Le système PQS peut activer le système RhII/RhlR mais le système RhII/RhlR inhibe le système PQS, afin d'avoir un ratio adéquat de 3-oxo-C12-HSL / C4-HSL (Papenfort and Bassler, 2016).

Différents signaux permettent de moduler le QS chez *Pseudomonas* tels que le phosphate, le fer, l'oxygène, mais aussi la cytokine humaine interféron- γ qui active le système Rhl (Lee and Zhang, 2015; Wu, 2005)

P. aeruginosa possède également un récepteur LuxR orphelin dénommé QscR (Papenfort and Bassler, 2016). Ce récepteur peut détecter des AHLs telles que C8-HSL, C10-HSL, 3-oxo-C10-HSL, C12-HSL, 3-oxo-C12-HSL and C14-HSL (Papenfort and Bassler, 2016). Cela permet à *P. aeruginosa* de détecter les autres espèces bactériennes alentours.

Cette inter-connectivité démontre de l'intégration de nombreux signaux extracellulaires et intracellulaires afin de réguler le QS de façon robuste. Le QS de *P. aeruginosa* contrôle plus de 300 gènes ; le rôle de l'activation du QS pour établir une infection aiguë et chronique a été démontrée dans de nombreux articles (Schuster *et al.*, 2013).

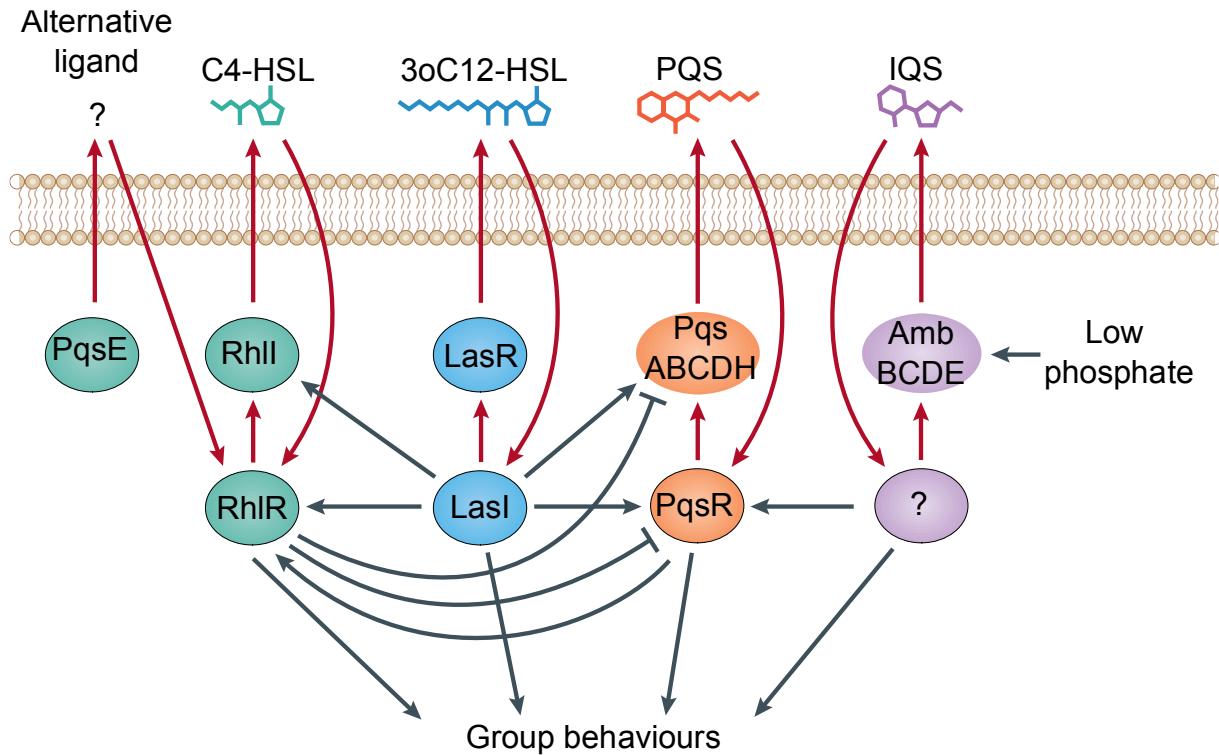


Figure 19 : Les différents systèmes de Quorum Sensing présents chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Les différents systèmes de Quorum Sensing sont interconnectés, permettant l'intégration des signaux et l'expression de nombreux gènes. d'après Mukherjee and Bassler, 2019.

En 2013, il a été rapporté la synthèse d'une AHL par une bactérie à gram positif du genre *Exiguobacterium*. Le gène codant pour la synthase a été isolé, il présente une séquence proche des LuxR présent dans les bactéries à Gram négatif, ainsi qu'un homologue de LuxI (Biswa and Doble, 2013). Une équipe a également étudié *in silico* la présence d'homologues putatifs LuxI/LuxR chez les bactéries à Gram positif. Les Firmicutes et les Actinobactéries possèdent des homologues de LuxR, et dans une moindre mesure LuxI, très probablement en raison d'un transfert horizontal de gènes dans les écosystèmes où bactéries à Gram positif et négatifs cohabitent (Rajput and Kumar, 2017).

AI-3 est un AI qui a été mis en évidence chez la bactérie entéro-hémorragique *Escherichia coli* O157:H7 (Sperandio *et al.*, 2003). Cette bactérie est présente dans le microbiote intestinal et est responsable de diarrhée hémorragique. Sperandio *et al.* ont démontré que l'adrénaline et la noradrénaline sont capables de se fixer sur le même récepteur qu'AI-3, démontrant potentiellement une structure proche (Sperandio *et al.*, 2003). Récemment, la structure et la biosynthèse d'AI-3 a été décrite et appartient à la classe des pyrazinones, molécules pouvant inhiber les protéases humaines et avoir des effets modulo-inflammatoires (Tableau 5) (Kim *et*

al., 2020). Les métabolites d'AI-3 peuvent moduler la sécrétion de cytokines, notamment l'IL-6 et l'IL-8 (Kim *et al.*, 2020). Le système AI-3/adrenaline/noradrénaline a été décrit chez d'autres bactéries dont les bactéries entéropathogènes *Shigella flexneri*, *Salmonella sp.*, *Yersinia sp.*, et est impliqué dans l'expression de gènes de virulence (Lustri *et al.*, 2017). Cela est confirmé par Kim *et al.* qui démontrent la production d'AI-3 par, entre autre, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica in vitro*, mais aussi *in vivo*, dans les fèces de souris (Kim *et al.*, 2020).

ii. Bactéries à Gram positif et Quorum Sensing

Les bactéries Gram positif utilisent des **oligopeptides** linéaires ou cycliques pour communiquer. L'AI est synthétisé dans le cytoplasme et sécrété dans le milieu grâce à un transporteur (Abisado *et al.*, 2018). A l'inverse des AHLs qui diffusent librement dans les cellules, les peptides du QS Gram positif se lient à des récepteurs membranaires déclenchant la transduction du signal permettant d'activer ou réprimer les gènes cibles, dont la synthèse de l'AI lui-même (Novick and Geisinger, 2008). Le QS des bactéries à Gram positif est moins connu que celui des bactéries à Gram négatif, et davantage de recherches sont nécessaires pour en comprendre tous les mécanismes.

iii. AI-2 : Quorum Sensing universel

Le système de communication inter-bactérien AI-2 est partagé par les bactéries à Gram positif et négatif et est donc qualifié « d'universel » car il peut transmettre des signaux inter-espèces. Bonnie Bassler et ses collègues ont beaucoup travaillé sur le sujet, ils ont démontré l'existence et caractérisé la structure et la signalisation d'AI-2 (Bassler *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2002; Ismail *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2004), qualifiant AI-2 d'« **Esperanto bactérien** ». AI-2 a été identifié pour la première fois dans les années 1990 chez *Vibrio harveyi*, comme AI régulant l'émission de bioluminescence (Galloway *et al.*, 2011). Le gène codant pour la synthèse d'AI-2, **LuxS**, a depuis été retrouvé dans de très nombreuses espèces (Galloway *et al.*, 2011). Il existe deux structures connues d'AI-2 : (2S,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuranborate (S-THMF-borate, BAI-2) (Chen *et al.*, 2002) et (2R,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran (R-THMF, AI-2) (Miller *et al.*, 2004) (Tableau 5).

Il est intéressant de noter que les cellules épithéliales de mammifères sont capables de synthétiser une **molécule « imitatrice »** d'AI-2 qui active le QS chez les bactéries en réponse à des molécules bactériennes et à une perturbation des jonctions serrées (Ismail *et al.*, 2016).

Par ailleurs, la surexpression d'AI-2 est capable d'augmenter la proportion de Firmicutes au détriment des Bacteroidetes lorsque le microboite de souris est perturbé par des

antibiotiques (Thompson *et al.*, 2015). Le QS de type AI-2 est donc capable de moduler la composition du microbiote intestinal.

Il est très intéressant de remarquer que le terme de QS commence à être utilisé pour parler de la **communication des cellules immunitaires**, en particulier les macrophages (parfois dénommé *Quorum Licensing*) (Muldoon *et al.*, 2020; Postat and Bousso, 2019; Postat *et al.*, 2018). Le *Colony-Stimulating Factor-1* (CSF-1) a été proposé comme auto-inducteur contrôlant la taille de la population cellulaire. Cependant, contrairement au QS bactérien, il s'agit plutôt de QS indirect, où l'auto-inducteur est produit par les cellules stromales et non par les macrophages. Le *Quorum Licensing* contrôlerait la production de cytokines telles que le TNF α , avec des boucles de rétrocontrôle (Muldoon *et al.*, 2020).

1. Quorum Quenching

Le **Quorum Quenching** (QQ) désigne tous les processus biotiques et abiotiques qui interviennent dans la dégradation du signal du QS (Whiteley *et al.*, 2017). La dégradation du signal peut se faire spontanément, par exemple un **pH basique** transforme les AHLs en acide tétramique (Grandclément *et al.*, 2016). Cette modification chimique est réversible spontanément, lorsque le pH est diminué. La **température** modifie également la stabilité des AHLs, en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée (Grandclément *et al.*, 2016). Cette modulation du signal par le pH est intéressante car les organismes tels que les plantes et les animaux peuvent augmenter leur température et leur pH lors d'une infection, permettant entre autres une dégradation des AI impliqués dans le QS et la virulence (Grandclément *et al.*, 2016).

Les deux principaux types d'enzymes pouvant dégrader les AHLs sont les **lactonases** (hydrolysant le noyau lactone pour donner une acyl-homosérine) et les **acylases** (clivant le lien amide), créant un acide gras et une homosérine lactone (Whiteley *et al.*, 2017). Il est important de noter que l'humain est capable de synthétiser des lactonases appelées Paraoxonases (PON). Cet élément sera développé dans le paragraphe III-B-4-ii.

Le QQ constitue une piste attirante pour développer des thérapies anti-microbiennes alternatives aux antibiotiques, rendues nécessaires par l'antibio-résistance. Le QQ ne tue pas les pathogènes mais permet de bloquer la production de facteurs de virulence (Wu *et al.*, 2020).

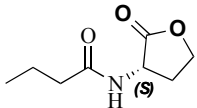
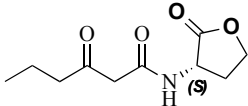
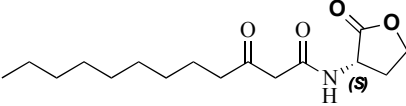
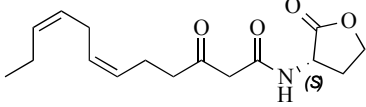
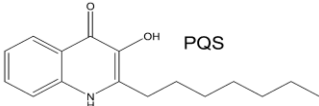
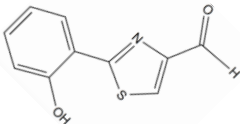
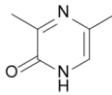
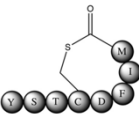
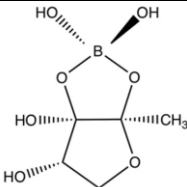
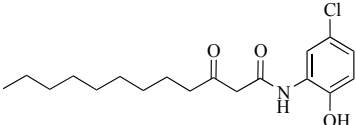
Auto-inducteur	Formule chimique	Exemple de bactéries productrices
Quorum Sensing des bactéries à Gram négatif		
Acyl-Homosérine Lactone	C4-HSL 	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	3oC6-HSL 	<i>Vibrio fischeri</i>
	3oC12-HSL 	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	3oC12:2-HSL 	?
PQS 	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
IQS 	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
AI-3 	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques	
Quorum Sensing des bactéries à Gram positif		
Oligopeptide 	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Quorum Sensing des bactéries à Gram négatif et positif		
AI-2 	<i>Vibrio harveyi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	
Analogie synthétique des AHLs		
Amino-Chloro-Phénol (ACP) 		

Tableau 5 : Vue d'ensemble des molécules utilisées par les bactéries pour leur Quorum Sensing d'après la thèse d'Agathe Peyrottes ; Abisado et al., 2018 ; Diggle et al., 2007 ; Kim et al., 2020 ; Lee and Zhang, 2015 ; Peyrottes et al., 2020

B. Effets inter-règnes des AHLs : dialogue entre l'hôte et son microbiote

Eucaryotes et procaryotes ont coexisté et évolué conjointement pendant de nombreuses années, permettant le développement de coopérations symbiotiques telles que dans l'intestin. Le processus est appelé **Signalisation Inter-Règne** (*Inter-Kingdom Signalling*). Ce terme a été utilisé pour la première fois par Shiner, Rumbaugh et Williams en 2005 (Shiner *et al.*, 2005), mais l'étude du phénomène est plus ancienne.

Nous n'aborderons qu'une partie de la signalisation inter-règne, les interactions entre les AHLs du QS et les cellules des mammifères. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* démontrent l'impact des AHLs sur les cellules immunitaires, les fibroblastes et les cellules épithéliales.

1. Effets des AHLs sur les cellules épithéliales et la barrière intestinale

L'impact des molécules du QS sur la fonction de barrière est particulièrement pertinent dans le contexte des infections pulmonaires à *P. aeruginosa* mais aussi au sein de l'écosystème intestinal, du fait de la promiscuité entre les bactéries et les cellules épithéliales intestinales. La plupart des études présentées ci-après développent les effets des AHLs de *Pseudomonas* (Figure 20).

La 3-oxo-C12-HSL exerce un effet **délétère sur la fonction de barrière épithéliale**. Dans un modèle de cellules épithéliales polarisées, Caco-2, en présence de la 3-oxo-C12-HSL (100-300µM), la **perméabilité** aux macromolécules et aux ions est augmentée (Vikström *et al.*, 2006). Cette hyperperméabilité est accompagnée d'une perturbation des complexes des jonctions intercellulaires, notamment des protéines occludine, ZO-1, E-cadhérine et la tricelluline dont l'expression et la localisation sont modifiées par rapport aux cellules contrôles (Eum *et al.*, 2014; Vikström *et al.*, 2006, 2009, 2010). Ces protéines présentent une augmentation de leur phosphorylation (Vikström *et al.*, 2009, 2010). De plus, 3-oxo-C12-HSL (50-400µM) active les métalloprotéinases matricielles MMP-2 et MMP-3 via les récepteurs activés par les protéases PAR (Eum *et al.*, 2014). Les MMPs sont des enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire qui interviennent également dans la régulation de la dégradation des protéines de jonctions (Rodríguez *et al.*, 2010). De façon intéressante, l'expression des MMP est augmentée dans le côlon de patients atteints de MICI (Naito and Yoshikawa, 2005).

Récemment, il a été démontré, par expériences de transplantation fécale, que la 3-oxo-C12-HSL provoquait une inflammation systémique et une perte de poids chez les souris (Cheng *et*

al., 2021). Du plus, l'AHL avait des effets délétères sur la morphologie et la taille du côlon, entraînant un défaut de barrière intestinal (Cheng *et al.*, 2021).

La signalisation calcique est largement impliquée dans les effets de la 3-oxo-C12-HSL sur les jonctions intercellulaires. En effet, l'inhibiteur de transporteur de calcium du réticulum endoplasmique (thapsigargine), atténue les effets de l'AHL sur la perméabilité paracellulaire dans les cellules Caco-2 (Vikström *et al.*, 2010). Ces résultats sont confirmés dans des cellules épithéliales pulmonaires, des fibroblastes et des cellules endothéliales où les effets pro-apoptotiques de la 3-oxo-C12-HSL (100µM) sont abolis en présence de la thapsigargine (Schwarzer *et al.*, 2014; Shiner *et al.*, 2006).

La perturbation de la fonction de barrière passe également par la mort des cellules épithéliales provoquée par la 3-oxo-C12-HSL comme démontrée par de multiples publications (Maurice *et al.*, 2019; Schwarzer *et al.*, 2014; Shiner *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2016, 2019, 2021)

De façon intéressante, la C4-HSL n'exerce aucun de ces effets délétères sur la lignée d'entérocytes Caco-2 (Eum *et al.*, 2014).

La 3-oxo-C12-HSL (10-100µM) altère également le fonctionnement de la **mitochondrie**, en modifiant sa morphologie, entraînant un dysfonctionnement respiratoire et énergétique. L'AHL provoque une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une oxydation de l'ADN mitochondrial et enfin l'apoptose de cellules pulmonaires (Maurice *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2021).

Dans les **cellules à mucus** (la lignée cellulaire LS174T) la 3-oxo-C12-HSL (100µM) augmente la production de ROS, activant la signalisation de la caspase 1 et 3 et affectant donc la viabilité des cellules (Tao *et al.*, 2016, 2019). De plus, il y a une augmentation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et une diminution de la production de mucines (Tao *et al.*, 2016, 2019).

Au-delà des effets sur la barrière, la 3-oxo-C12-HSL module également la réponse inflammatoire de l'hôte. Comme évoqué précédemment, les cellules épithéliales peuvent être considérées comme cellules de l'immunité innée. La 3-oxo-C12-HSL (100µM) induit une sécrétion plus importante d'IL-6, cytokine pro-inflammatoire, par des cellules épithéliales pulmonaires modèle de mucoviscidose (invalidées pour des gènes rencontrés lors de cette pathologie) et est dépendante de la signalisation calcique (Jahoor *et al.*, 2008; Mayer *et al.*,

2011). De plus, la C4-HSL n'induit aucune de ces réponses aux mêmes concentrations (Mayer *et al.*, 2011).

2. Effets des AHLs sur l'immunité innée

Les effets des AHLs sur les cellules immunitaires ne sont pas toujours concordants et sont dépendant de la concentration, du modèle étudié et des conditions expérimentales. Il est indiqué pour chaque étude citée les concentrations en AHLs utilisées. Les effets sont rassemblés dans le tableau 6.

i. Les cellules dendritiques

La 3-oxo-C12-HSL induit, selon les publications, une augmentation d'IL-10 par des DC humains (Li *et al.*, 2015) et à la fois une absence d'effet sur cette cytokine chez la souris (Skindersoe *et al.*, 2009). En revanche, la production d'IL-12 est diminuée en présence de 3-oxo-C12-HSL de façon dose dépendante, chez la souris mais aussi chez l'Homme (Li *et al.*, 2015; Skindersoe *et al.*, 2009). De plus, les DCs stimulées par la 3-oxo-C12-HSL (5-100 μ M) induisent préférentiellement la différenciation des Treg plutôt que des LT CD4 (Li *et al.*, 2015). Ces résultats démontrent la capacité de la 3-oxo-C12-HSL à diminuer la réponse anti-microbienne des DCs pour installer une infection chronique de *P. aeruginosa*.

ii. Les neutrophiles

La 3-oxo-C12-HSL (0,1-200 μ M) de *P. aeruginosa* et la 3-oxo-C10-HSL (12,5-200 μ M) de *Burkholderia sp* (pathogène opportuniste retrouvé lors d'infection chez les patient atteints de mucoviscidose) sont des **chimioattractants** pour les neutrophiles humain issus de culture primaire (Karlsson *et al.*, 2012a; Zimmermann *et al.*, 2006). Les effets observés sont abolis en présence de thapsigargine, inhibiteur de la signalisation calcique (Karlsson *et al.*, 2012a). L'implication du **calcium** dans la signalisation des AHLs converge vers les résultats décrits précédemment dans les cellules épithéliales.

Les *Mitogen-activated protein kinases* (**MAPK**) sont impliqués dans la signalisation de la 3-oxo-C12-HSL (10 μ M, 100 μ M). En réponse à l'exposition à l'AHL, la p38 MAPK est rapidement phosphorylée, déclenchant une cascade de signalisation résultant en la polymérisation de l'actine (Kahle *et al.*, 2013).

Comme pour les cellules épithéliales, la 3-oxo-C12-HSL (3-100 μ M) exerce des effets **pro-apoptotiques** sur les neutrophiles (Singh *et al.*, 2019; Tateda *et al.*, 2003).

De nouveau, la C4-HSL ne possède pas les même propriétés que les AHLs à chaîne longue (Karlsson *et al.*, 2012a; Singh *et al.*, 2019; Zimmermann *et al.*, 2006), même s'il est à noter que cette AHL induit un changement dans l'organisation de l'actine (Karlsson *et al.*, 2012a).

iii. Les macrophages

Les propriétés immuno-modulatrices de la 3-oxo-C12-HSL sur les macrophages ont été amplement étudiées. Cette AHL exerce des effets aboutissant à une **diminution de la réponse inflammatoire**, permettant la mise en place d'une infection chronique par *Pseudomonas aeruginosa*. Le premier article à s'intéresser à l'activité modulo-inflammatoire des AHLs date de 1998. Telford *et al.* démontrent que les macrophages murins stimulés par du LPS (1µg/mL) sécrètent moins de TNFα et d'IL-12 en présence de 3-oxo-C12-HSL (30µM).

Dans la lignée de macrophages murins RAW264.7 stimulés par du LPS (10ng/mL), la 3-oxo-C12-HSL (10-50µM) stimule la production d'IL-10 de façon dose dépendante tandis que la sécrétion de TNFα diminue (Glucksam-Galnoy *et al.*, 2013). Cela est confirmé sur des macrophages murins péritonéaux (Glucksam-Galnoy *et al.*, 2013). L'implication de la **MAPK p38** dans la signalisation de la 3-oxo-C12-HSL est proposée par plusieurs groupes (Glucksam-Galnoy *et al.*, 2013; Kravchenko *et al.*, 2006; Vikström *et al.*, 2005). La 3-oxo-C12-HSL (10-25µM) peut moduler la voie **NF-κB** lorsque les cellules étaient dans un contexte pro-inflammatoire (LPS 100ng/mL), résultant en une diminution de l'expression de gènes codant des protéines pro-inflammatoires telles que TNFα, RANTES, MCP-1 (Kravchenko *et al.*, 2008).

De façon intéressante, la signalisation de la 3-oxo-C12-HSL (5-50µM) ne semble pas passer par la voie canonique des TLR (Kravchenko *et al.*, 2006). En effet, dans des macrophages murins, l'invalidation pour le gène TLR2 ou TLR4 n'empêche pas, entre autre, la phosphorylation de p38, lorsque les cellules sont exposées à l'AHL (Kravchenko *et al.*, 2006). Les TLR sont les récepteurs canoniques des PAMPs et il semble surprenant que les AHLs, molécules d'origine bactérienne, n'activent pas ces récepteurs.

Par ailleurs, l'**UPR**, en réponse à un défaut de repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique, est activé en présence de 3-oxo-C12-HSL à une dose faible de 6,25µM (Zhang *et al.*, 2014).

De même que dans les cellules épithéliales, l'exposition de macrophages à la 3-oxo-C12-HSL (12-50µM) induit leur **apoptose** (Tateda *et al.*, 2003).

Une caractéristique importante des macrophages est leur capacité à **phagocyter** les particules étrangères. Les macrophages humains présentent une activité de phagocytose augmentée en présence de 3-oxo-C12-HSL (100µM) (Holm *et al.*, 2015; Vikström *et al.*, 2005). Contrairement à ce qui a été rapporté dans d'autres modèles cellulaires, Vikström *et al.* ne notent pas d'augmentation de la production de ROS. En revanche, l'équipe confirme

l'implication de la MAPK p38 (mais pas de p42/44), et son inhibition abolit l'augmentation de la phagocytose provoquée par la 3-oxo-C12-HSL (Vikström *et al.*, 2005).

La 3-oxo-C12-HSL (10-50 μ M) a des effets sur le **volume et la forme cellulaire** des macrophages humains (Holm *et al.*, 2016). L' AHL induit l'augmentation de l'expression de l'aquaporine 9, protéine formant des pores membranaires et impliquée dans les mouvement d'eau (Holm *et al.*, 2015, 2016). Les aquaporines interagissent directement avec le cytosquelette et induisent des cascades de signalisation aboutissant à un remodelage du cytosquelette. Les changements de forme et de volume des macrophages jouent un rôle important dans leur capacité de phagocytose.

Une publication rapporte les effets immunomodulateurs d'AHLs dérivées de la bactérie opportuniste *Chromobacterium violaceum*, notamment la dodecanoyl-HSL (C12-HSL), identique à la 3-oxo-C12-HSL de *Pseudomonas*, mais dépourvue de la fonction cétone. Les macrophages RAW264.7 exposés à la C12-HSL (35,28 μ M) à l'état basal sécrètent plus de TNF α et d'IL-1 β que les cellules contrôles (Gomi *et al.*, 2006). La 3-oxo-C10-HSL et la 3-oxo-C14-HSL induit une phosphorylation de la **MAPK p38** des macrophages (Kravchenko *et al.*, 2006).

Les bactéries *Acinetobacter baumannii* et *Acinetobacter nosocomialis*, pathogènes responsables de maladies nosocomiales synthétisent la 3-OH-C12-HSL (Woo *et al.*, 2021). Cette AHL similaire à l'AHL de *P. aeruginosa*, exerce les mêmes effets : diminution de la viabilité cellulaires, effets pro-inflammatoires, induction du calcium intra-cellulaire, production de ROS et activation du stress du reticulum (Woo *et al.*, 2021).

Comme dans les types cellulaires abordés précédemment, la C4-HSL n'exerce pas d'effets immunomodulateurs (Kravchenko *et al.*, 2006) ou pro-apoptotiques (Tateda *et al.*, 2003) sur les macrophages.

Type cellulaire	Effets de la 3-oxo-C12-HSL	Références
Cellules de l'immunité innée		
Macrophages	Propriétés anti-inflammatoires à travers IL-12 et TNF α (0.1-100 μ M)	Telford <i>et al.</i> , 1998
	Effets Pro-apoptotiques (12-50 μ M)	Tateda <i>et al.</i> , 2003
	Augmentation de la phagocytose (100 μ M)	Vikström <i>et al.</i> , 2005
	Inhibition de la voie NF-kB (4.7 μ M)	Kravchenko <i>et al.</i> , 2008
	Effets anti-inflammatoires dose-dépendants (1-50 μ M)	Glucksam-Galnoy <i>et al.</i> , 2013
	Implication de la voie des MAPK p38 dans la signalisation (1-100 μ M)	Glucksam-Galnoy <i>et al.</i> , 2013; Kravchenko <i>et al.</i> , 2006; Vikström <i>et al.</i> , 2005
	Activation de l' <i>Unfold Protein Response</i> (6.25-100 μ M)	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	Modification du volume et de la forme cellulaire (10-50 μ M)	Holm <i>et al.</i> , 2016
Cellules dendritiques	Effets pro-apoptotiques (100 μ M)	Boontham <i>et al.</i> , 2008
	Pas d'effet sur la sécrétion d'IL-10 (5-30 μ M)	Skindersoe <i>et al.</i> , 2009
	Augmentation de la production d'IL-10 (5-100 μ M)	Li <i>et al.</i> , 2015
	Diminution de la sécrétion d'IL-12 (5-100 μ M)	Li <i>et al.</i> , 2015; Skindersoe <i>et al.</i> , 2009
	Augmentation de l'induction des Treg (5-100 μ M)	Li <i>et al.</i> , 2015
Neutrophiles	Chimioattractant (0.01-100 μ M)	-Karlsson <i>et al.</i> , 2012b; Zimmermann <i>et al.</i> , 2006
	Génération de ROS ((3-100 μ M)	(Singh <i>et al.</i> , 2019)
	Activation des MAPK (12-50 μ M)	Kahle <i>et al.</i> , 2013
	Effet pro-apoptotique (12-50 μ M)	Singh <i>et al.</i> , 2019; Tateda <i>et al.</i> , 2003
Cellules de l'immunité adaptative		
Lymphocytes T	Inhibition de la prolifération et de l'activation (0.1-100 μ M)	Boontham <i>et al.</i> , 2008; Gupta <i>et al.</i> , 2011; Hooi <i>et al.</i> , 2004; Telford <i>et al.</i> , 1998
	Activation des lymphocytes T vers un phénotype Th1 (5 μ M)	Smith <i>et al.</i> , 2002
	Réduction de la sécrétion d'IL-4 et d'IFN γ (5 μ M)	Ritchie <i>et al.</i> , 2005
	Induction de l'apoptose via la voie mitochondriale (100 μ M)	Jacobi <i>et al.</i> , 2009
	Induction des lymphocytes T régulateurs (1-50 μ M)	Li <i>et al.</i> , 2015
Lymphocytes B	Modulation de la production d'immunoglobines (0.1-100 μ M)	Telford <i>et al.</i> , 1998 ; Ritchie <i>et al.</i> , 2003

Cellules épithéliales		
Cellules épithéliales intestinales	Altération de l'intégrité de la barrière (100-400µM)	(Cheng <i>et al.</i> , 2021; Eum <i>et al.</i> , 2014; Song <i>et al.</i> , 2019; Vikström <i>et al.</i> , 2006, 2009, 2010)
	Modulation de la migration (1.5-12µM)	Karlsson <i>et al.</i> , 2012b
	Génération de ROS (10-100µM)	(Maurice <i>et al.</i> , 2019; Tao <i>et al.</i> , 2021)
	Diminution de la viabilité cellulaire (100-400µM)	Tao <i>et al.</i> , 2016
	Modulation de l'expression d'IL-8 (1-50µM)	(Landman <i>et al.</i> , 2018; Peyrottes <i>et al.</i> , 2020)
Cellules épithéliales pulmonaires	Augmentation de l'expression d'IL-8 (100µM)	(Jahoor <i>et al.</i> , 2008; Smith <i>et al.</i> , 2001)

Tableau 6 : Tableau récapitulant les effets de la 3-oxo-C12-HSL sur les cellules eucaryotes (voir figure 20)

3. Effets des AHLs sur l'immunité adaptative

L'étude de l'impact des AHLs sur les cellules de l'immunité adaptative est plus restreinte que sur l'immunité innée. De plus, les effets rapportés sont souvent **contradictaires**.

Telford *et al.* signent le premier article rapportant des effets sur les lymphocytes. La 3-oxo-C12-HSL (70-100µM) **inhibe la prolifération des LT** de la rate de souris (Telford *et al.*, 1998). Cela a également été rapporté sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) humains stimulés par 1-100µM de 3-oxo-C12-HSL (Hooi *et al.*, 2004), qui induit également **la production d'Immunoglobuline E (IgE)** (Telford *et al.*, 1998). Les IgE sont les anticorps sécrétés par les plasmocytes, différenciés à partir de lymphocytes B et sont impliqués dans la défense contre les parasites. Ces observations traduisent plutôt une **réponse Th2**. Ces résultats ont été remis en cause (Ritchie *et al.*, 2003, 2005; Smith *et al.*, 2002a). D'une part la 3-oxo-C12-HSL (5µM) stimule les LT activés, induisant la sécrétion d'IFN γ , promouvant **une réponse Th1** (Smith *et al.*, 2002a). D'autre part, Ritchie *et al.* démontrent que la 3-oxo-C12-HSL (10µM) inhibe la sécrétion de cytokines des lymphocytes murins, inhibe la réponse pro-inflammatoire **Th1 ou Th2** (Ritchie *et al.*, 2003, 2005).

Par ailleurs, lorsque des DCs dérivés de moelle osseuse sont en contact avec la 3-oxo-C12-HSL (5-100µM), elles induisent la **différenciation des LT en Treg** avec une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et une diminution de l'IFN γ et de l'IL-12 (Li *et al.*, 2015), démontrant le caractère anti-inflammatoire de la 3-oxo-C12-HSL. Cela permet de constater que les effets de l'AHL sur un type de cellule spécifique ont également un impact indirect sur d'autres types de cellules.

De plus, il n'y a pas de **cytotoxicité** de la 3-oxo-C12-HSL sur les LT spléniques à des concentrations faibles (1-10µM) (Ritchie *et al.*, 2005). A contrario, la 3-oxo-C12 (10-100µM) entraîne l'apoptose des cellules de la lignée Jurkat (lignée cellulaire de LT) via la voie mitochondriale (Jacobi *et al.*, 2009). On peut noter que parmi 7 AHLs testées, la 3-oxo-C12-HSL (ayant la chaîne carbonée la plus longue) est la seule toxique (Jacobi *et al.*, 2009).

Concernant les **récepteurs**, des lymphocytes issus de PBMC exposés à la 3-oxo-C12-HSL (1-100µM) **augmentent l'expression de TLR2** de façon dose dépendante, tout en inhibant la sécrétion de TNF α (Bao *et al.*, 2017). Ces résultats sont intéressants car il a été démontré que la signalisation de la 3-oxo-C12-HSL ne passe pas par les TLR (Kravchenko *et al.*, 2006).

Ces résultats concernant l'impact de la 3-oxo-C12-HSL sur les cellules immunitaires ou sur les cellules épithéliales ne mettent pas en évidence d'effets consensuels (Figure 20), mais il

est possible de voir que les effets pro-inflammatoires ont lieu en général dans des cellules à l'état basal, tandis que les effets anti-inflammatoires sont observés dans des cellules activées par du LPS ou des cytokines. Ces effets anti-inflammatoires aboutissent à une suppression de la réponse immunitaire vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* permettant de mettre en place une infection chronique.

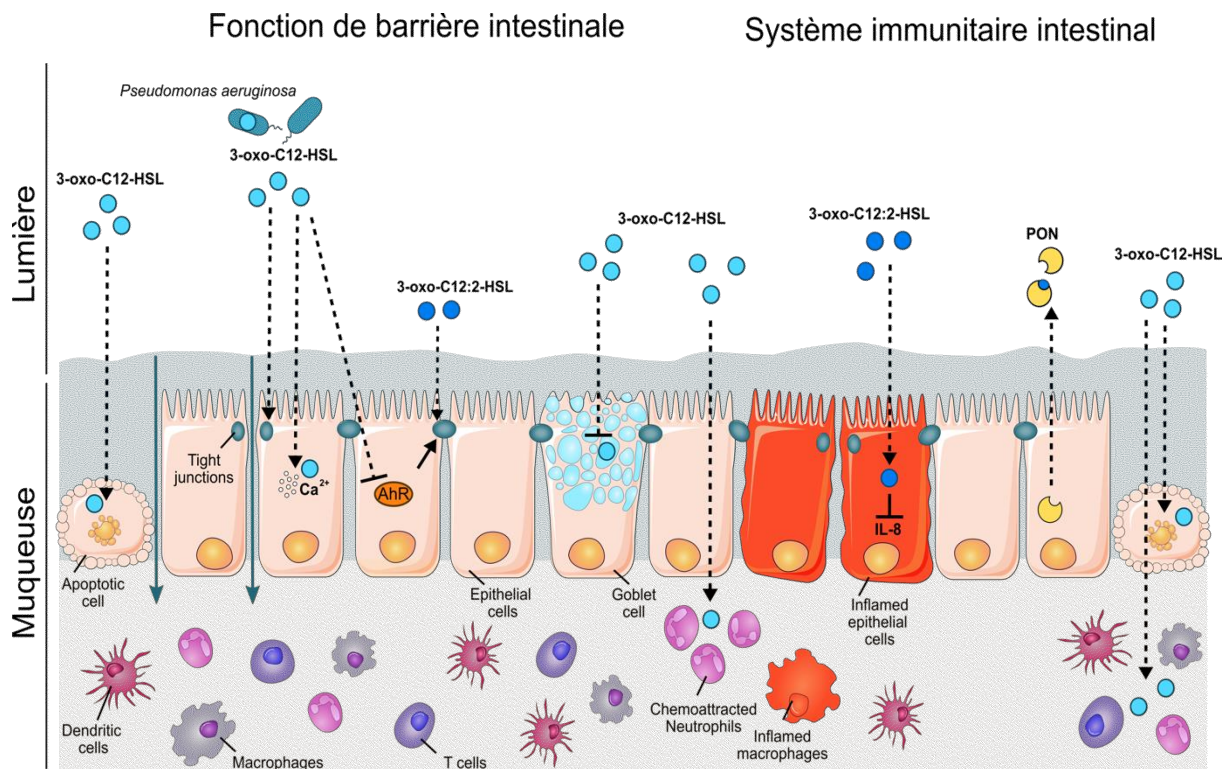


Figure 20 : Effets des AHLs sur la fonction de barrière intestinale et sur la réponse immunitaire (voir tableau 6).

La 3-oxo-C12-HSL de *Pseudomonas aeruginosa* induit l'apoptose dans de nombreux types cellulaires, dont les cellules épithéliales, provoquant une perturbation de la barrière intestinale. De plus, la 3-oxo-C12-HSL désorganise les jonctions serrées, augmentant la perméabilité paracellulaire et module également la production de mucus. A l'inverse, la 3-oxo-C12:2-HSL exerce des effets protecteurs sur les jonctions serrées. Tandis que la 3-oxo-C12-HSL stimule la chimioattraction et la phagocytose des neutrophiles ainsi que la mort cellulaire, ses effets sur les cellules immunitaires sont plus complexes (voir tableau 6). LA 3-oxo-C12:2-HSL induit une diminution de la production d'IL-8 par les cellules épithéliales. Il reste encore nécessaire d'identifier les mécanismes permettant aux AHLs de traverser la barrière et atteindre les cellules immunitaires dans un contexte physiologique *in vivo*. D'après Coquant *et al*, 2021

4. Cibles eucaryotes des AHLs

Plusieurs questions demeurent concernant la signalisation des AHLs dans les cellules eucaryotes, notamment leur entrée dans les cellules. D'une part, de par leur caractère lipophile, les AHLs peuvent rentrer dans les cellules de façon passive jusqu'à atteindre un équilibre de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique des lymphocytes T et des DC (Ritchie *et al.*, 2007). Une étude récente a démontré que la 3-oxo-C12-HSL de *Pseudomonas* était capable de s'incorporer aux lipides de la membrane plasmique et d'induire sa désorganisation entraînant l'apoptose du lymphocyte (Song *et al.*, 2019). De façon contradictoire, en présence de 3-oxo-C12-HSL, l'expression des transporteurs ABC est augmentée dans des cellules épithéliales pulmonaires (Bryan *et al.*, 2010). En présence d'un inhibiteur de ces récepteurs, l'AHL ne traversait plus la membrane (Bryan *et al.*, 2010). Il est donc possible que le mode d'entrée des AHLs dépend du type cellulaire.

D'autre part, l'hypothèse de récepteurs membranaires se pose également.

i. Absence de récepteur défini

Les réponses eucaryotes à la 3-oxo-C12-HSL ne dépendent pas des TLR et des récepteurs NOD, contrairement à ce qui est fréquemment observé avec les molécules d'origine microbiennes (Kravchenko *et al.*, 2006). Une étude contradictoire suggère toutefois que la 3-oxo-C12-HSL induit l'expression de TLR2 et que ce récepteur est nécessaire pour exercer ses effets immunomodulateurs dans les cellules épithéliales de cornée humaine (Hu *et al.*, 2021).

Aucun récepteur n'a été clairement identifié pour les AHLs. Comme développé précédemment, l'implication de différentes voies et processus cellulaires ont été associées à la réponse à la 3-oxo-C12-HSL : NF- κ B (DiMango *et al.*, 1998; Kravchenko *et al.*, 2008), les MAPK (Glucksam-Galnoy *et al.*, 2013; Kravchenko *et al.*, 2006; Vikström *et al.*, 2005), la signalisation calcique (Schwarzer *et al.*, 2014; Vikström *et al.*, 2010), l'UPR (Zhang *et al.*, 2014), l'apoptose (Maurice *et al.*, 2019; Tateda *et al.*, 2003).

ii. PPAR γ

Néanmoins, il a été montré par plusieurs groupes que la 3-oxo-C12-HSL interagit avec le *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma* (PPAR γ) et ce à des concentrations très faibles, 1nM (Cooley *et al.*, 2010). Les PPAR sont des facteurs de transcription liés à la membrane nucléaire qui jouent un rôle important dans le métabolisme des lipides et dans l'inflammation (Cooley *et al.*, 2010; Jahoor *et al.*, 2008). L'inhibition de PPAR γ a un effet pro-

inflammatoire sur les cellules. L'AHL agit comme antagoniste de PPAR γ et empêche la liaison du facteur de transcription à l'ADN (Cooley *et al.*, 2010; Jahoor *et al.*, 2008).

iii. IQGAP1

En étudiant l'impact de la 3-oxo-C12-HSL sur la migration cellulaire, Karlsson *et al.* ont mis en évidence une interaction entre l'AHL et IQ-motif containing GTPase-Activating Protein (**IQGAP1**) (Karlsson *et al.*, 2012b).

IQGAP1 est une protéine d'échafaudage impliquée dans la signalisation et l'organisation du cytosquelette (Tanos *et al.*, 2018). Elle possède également un rôle dans l'assemblage des jonctions serrées, notamment en interagissant avec les claudines (Tanos *et al.*, 2018). L'interaction 3-oxo-C12-HSL / IQGAP1 semble donc une piste intéressante, étant donné que l'AHL perturbe l'organisation de la barrière intestinale et ses jonctions serrées.

iv. AhR

Il a très récemment été démontré que la 3-oxo-C12-HSL de *Pseudomonas* interagit avec le récepteur d'aryl d'hydrocarbone (AhR) et en inhibant la signalisation du récepteur (Moura-Alves *et al.*, 2019). L'étude a été menée sur plusieurs types cellulaires *in vitro*, dont des macrophages et des cellules épithéliales, mais également *in vivo* dans des modèles murins et de poisson zèbre.

v. T2R138

Une autre cible cellulaire potentielle des AHLs est la protéine **T2R38**. C'est une protéine faisant partie de la famille des récepteurs du goût amer (*bitter taste receptor* ; **BTR**). Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G (**RCPG**) (Avau and Depoortere, 2016). Au départ identifié dans l'épithélium de la cavité buccale, il a été découvert que les BTR sont exprimés dans de nombreux tissus extra-oraux, tels que les poumons, l'intestin, le cerveau... Les BTR peuvent être activés par de nombreuses molécules, naturelles comme synthétiques mais tous les BTR n'ont pas de ligand identifiés (Avau and Depoortere, 2016). Leur signalisation implique la protéine G nommée **Gustducine** et la phospholipase β_2 et, grâce au message secondaire inositol triphosphate (**IP₃**), aboutit au relargage du **calcium** du réticulum endoplasmique (Figure 21) (Lu *et al.*, 2017).

L'étude des récepteurs du goût amer au-delà de la cavité buccale suscite de plus en plus d'intérêt. D'une part, les récepteurs du goût influencent notre régime alimentaire, qui est un facteur important dans les MICI. De plus, les récepteurs du goût sont exprimés tout le long du tractus digestif (Jeon *et al.*, 2011; Latorre *et al.*, 2016; Turner *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2015) ainsi que par les cellules immunitaires (Maurer *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2018; Verbeurgt *et al.*, 2017).

Des souris invalidées pour le gène codant pour la gustducine sont plus sensibles aux colites inflammatoires, avec une augmentation du TNF α et de l'IFN γ (Feng *et al.*, 2018a). Cela suggère un rôle des BTR dans la modulation de l'inflammation intestinale. Un site internet recense les BTR et leurs ligands connus et permet également de tester de potentiels ligands (Dagan-Wiener *et al.*, 2019). Par ailleurs, plusieurs agonistes des BTR ont un effet anti-inflammatoire en diminuant la production de TNF α et d'IL-8 dans des macrophages pulmonaires humains (Grassin-Delye *et al.*, 2019).

Du fait de son interaction avec la 3-oxo-C12-HSL, nous nous focaliserons sur un récepteur spécifique, **T2R38**, qui sera dénommé par la suite hT2R38 pour la protéine humaine et mT2R138 pour l'orthologue murin. Plusieurs agonistes synthétiques pour hT2R38 et mT2R138 ont été identifiés, notamment le PhénylThioCarbamide (PTC) (Avau and Depoortere, 2016).

Lee *et al.* démontrent que, dans l'épithélium pulmonaire humain, hT2R38 est activé par la 3-oxo-C12-HSL et la C4-HSL, activant des **effets antibactériens** (Lee *et al.*, 2012). De façon intéressante, les polymorphismes de *TAS3R38* sont liés à la capacité de l'individu à éliminer *Pseudomonas aeruginosa*, démontrant que certaines personnes sont plus sensibles aux infections (Lee *et al.*, 2012). Ces résultats ont également été retrouvés chez la souris (Lee *et al.*, 2014).

Une interaction entre hT2R38 et la 3-oxo-C12-HSL a également été montrée dans les **neutrophiles** isolés du sang circulant humain. Cette interaction a été observée par co-localisation par immunofluorescence et par co-immunoprécipitation à l'aide de l'AHL couplée à une biotine (Maurer *et al.*, 2015). Il est intéressant de noter que hT2R38 a été par ailleurs localisé dans les **gouttelettes lipidiques** des neutrophiles et des cellules pancréatiques cancéreuses (Gaida *et al.*, 2016; Maurer *et al.*, 2015). Le même groupe a montré qu'en réponse à l'activation de hT2R38 par le PTC ou la 3-oxo-C12-HSL, la MAPK p38 est activée, ce qui est cohérent avec les résultats décrits plus hauts (Gaida *et al.*, 2016).

Plusieurs articles rapportent l'activation de la phospholipase C ainsi que l'implication de l'IP₃ dans la signalisation induite par la 3-oxo-C12-HSL (Schwarzer *et al.*, 2014; Shiner *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2018), ce qui est un argument en faveur de la signalisation des AHLs via un RCPG, dont T2R38.

Par une approche de type étude structure-fonction, les acides aminés impliqués dans les interactions entre plusieurs récepteurs du goût amer (T2R, T2R14, T2R20) et la 3-oxo-C12-HSL ont été identifiés (Jagupilli *et al.*, 2018). Cette étude a permis d'avoir plus d'informations mécanistiques sur les interactions entre le récepteur et son ligand, pour mieux comprendre ces « capteurs bactériens ».

Par ailleurs, de nombreuses autres molécules bactériennes peuvent activer hT2R38, comme cela a été démontré dans une étude de screening dans des cellules rapportrices (Verbeurgt *et al.*, 2017).

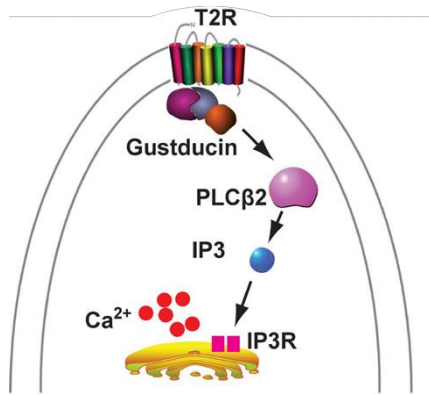


Figure 21 : Signalisation canonique des récepteurs du goût amer. Les récepteurs du goût amers (T2R) sont des récepteurs couplés à une protéine G. Leur activation aboutit au relargage du calcium du réticulum endoplasmique. T2R : récepteur du goût amer ; PLCβ2 : Phospholipase β2 ; IP3 : Inositol triphosphate ; Ca²⁺ : ion calcium ; IP3R : Récepteur IP3 D'après Lu *et al.*, 2017

Dans le cadre de ce modèle où les métabolites bactériens seraient reconnus par les récepteurs du goût amer, une association entre susceptibilité à la rhinosinusite chronique et les polymorphismes des BTR, en particulier hT2R38 a été mise en évidence. Les homozygote PAV/PAV (Proline Alanine Valine ; dénommés « supertasteurs ») sont moins sensibles que les AVI/AVI (Alanine Valine Isoleucine ; dénommés « non-tasteurs ») (Jeruzal-Świątecka *et al.*, 2020). Plus récemment, les récepteurs du goût ont suscité un intérêt dans la crise du Covid-19. Un des symptômes du SARS-CoV-2 est la perte du goût et de l'odorat, aussi a-t-il été étudié les phénotypes des BTR. Une étude de 2000 sujets a montré une association entre les « non-tasteurs » qui étaient plus susceptibles d'avoir une forme plus grave du Covid-19 que les supertasteurs (Barham *et al.*, 2021).

Il serait intéressant d'identifier les récepteurs eucaryotes des AHLs, afin de pouvoir mieux comprendre les mécanismes d'action de ces molécules sur l'hôte. Un modèle où les AHLs agiraient à la fois sur un récepteur membranaire mais aussi en intra-cellulaire en rentrant par diffusion passive doit également être envisagé.

5. Réponse des cellules de l'hôte au Quorum Sensing

i. Les Paraoxonases

Dans le cadre de la signalisation inter-règne, les mammifères sont capables de synthétiser des **lactonases**, qui « ouvrent » le noyau lactone des AHLs en l'hydrolysant (Grandclément *et al.*, 2016). Ces enzymes dépendantes du calcium sont appelées Paraoxonases (PON) et il en existe trois types. Les PON1, PON2 et PON3 sont hautement conservées chez les vertébrés, en

particulier chez les mammifères. Les PON1 et PON3 sont principalement exprimées dans le foie et les reins et ensuite sécrétées dans le sérum, tandis que la PON2 est exprimée dans de nombreux tissus et est principalement intra-cellulaire (Grandclément *et al.*, 2016). Concernant l'intestin humain, il y a une plus forte expression de la PON2 dans le jéjunum que dans le duodénum, l'iléon et le côlon (Levy *et al.*, 2007). La PON2 a la plus grande efficacité pour cliver les AHLs (Teiber *et al.*, 2008). En effet, la PON1 est connue pour son activité sur les organophosphates contenus dans les insecticides notamment, mais aussi sur les acides gras en clivant les noyaux lactones (Grandclément *et al.*, 2016). Les PONs présentent une forte efficacité contre les AHLs à chaînes longues telles que la 3-oxo-C12-HSL, mais peu contre la C4-HSL (Grandclément *et al.*, 2016).

De façon intéressante, les PON1 et 3 sont moins exprimées dans l'intestin des patient MC et RCH par rapport à des sujets sains (Rothem *et al.*, 2007).

La 3-oxo-C12-HSL induit l'augmentation du calcium intra-cellulaire. Le calcium déclenche la dégradation de l'ARNm et la protéine PON2 (Horke *et al.*, 2008). *Pseudomonas aeruginosa* est donc capable de réduire la défense cellulaire en neutralisant la PON2, en plus de diminuer la réponse inflammatoire.

La PON2 exerce également des propriétés anti-oxydante dans les cellules Caco-2, lignée de cellules épithéliale intestinale (Levy *et al.*, 2007; Précourt *et al.*, 2012).

En fonction des études, un inhibiteur de paraoxonase est utilisé. Néanmoins, une équipe a démontré qu'en présence d'un inhibiteur de PON2 (Triazolo[4,3-a]quinolone, TQ416), la 3-oxo-C12-HSL n'avait plus d'effets pro-apoptotiques sur la lignée de cellules épithéliales coliques LS174T, démontrant de la nécessité de la PON intra-cellulaire pour une signalisation de l'AHL (Tao *et al.*, 2016).

ii. Molécules de communication de l'hôte et Quorum Sensing

Une étude pilote publiée en 1992 a démontré que les catécholamines (comprenant l'adrénaline) favorisent la croissance des bactéries et leur virulence (Lyte and Ernst, 1992). En conséquence, le terme **d'endocrinologie microbienne** a été proposé dans les années 1990 pour décrire l'étude des effets des **hormones** de l'hôte sur la croissance, le métabolisme et la virulence des bactéries (Lyte, 2004). Comme discuté précédemment pour le système AI-3 et l'adrénaline/noradrénaline (Sperandio *et al.*, 2003), certaines hormones eucaryotes peuvent interagir avec le QS. Les AHLs possèdent une structure et un mécanisme d'action proche de certaines hormones synthétisées par les mammifères. Étant donné que les cellules de mammifères réagissent en présence d'AHLs, dans le cadre du QS il paraît naturel de faire

l'hypothèse que réciproquement ces hormones ont également un impact sur les cellules procaryotes.

L'étude de l'impact des hormones et cytokines sur la formation des biofilms et la virulence est notamment motivée par le besoin de trouver de nouvelles molécules anti-microbiennes pour lutter contre l'antibio-résistance.

C. Le Quorum Sensing dans l'intestin

1. Connaissances actuelles

Au vu du nombre de bactéries et de leur diversité dans l'intestin, il semble cohérent d'y envisager la présence physiologique de molécules du QS. Par ailleurs, le QS étant fortement associé à la notion de virulence, il est également intéressant de s'interroger sur l'existence de molécules du dialogue bactérien dans l'intestin dans un contexte infectieux et pathologique.

La présence d'AI-2 dans l'intestin de mammifères a été démontrée par plusieurs articles (Kaper and Sperandio, 2005; Li *et al.*, 2019; Sperandio *et al.*, 2003). AI-2 étant considéré comme « langage universel », il n'est pas surprenant de retrouver cet AI dans un écosystème aussi complexe que l'intestin.

Il existe de nombreuses études *in vitro* sur la production des AHLs et leur impact sur les cellules eucaryotes, mais peu ont été menées *in vivo*, sur des écosystèmes complexes. Certaines bactéries pathogènes telles que *Yersinia enterocolitica* possèdent le système de production et détection des AHLs, tandis que d'autres pathogènes entériques tels que *Salmonella sp* possède seulement le récepteur SdiA (Swearingen *et al.*, 2013). Jusqu'à récemment la présence d'AHLs n'avait jamais été mise en évidence dans les bactéries commensales intestinales. Des analyses bio-informatiques issus de *The Human Microbiome Project* ont permis d'identifier le récepteur aux AHLs SdiA dans de nombreuses bactéries commensales, parmi lesquelles *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. Cette même analyse a pu détecter trois organismes possédant la paire d'homologues LuxI/LuxR : *Hafnia alvei*, *Edwardsiella tarda*, and *Ralstonia sp.* strain 5_7_47FAA (Swearingen *et al.*, 2013).

Il est intéressant de noter que, grâce à l'utilisation de systèmes rapporteurs bactériens, des AHLs ont été retrouvées dans l'écosystème de rumen de vaches (Erickson *et al.*, 2002a). La nature des AHLs ou les bactéries productrices n'ont pas pu être identifiées. Un article récent analyse une base de données métagénomiques de près de 450 rumens différents de vaches. Ils mettent en évidence la présence du gène de synthèse LuxI, chez les bactéries à Gram négatif du genre *Citrobacter sp.* et un homologue de LuxR est présent chez 4,5% des Gram positif et 5,1% des Gram négatif (Won *et al.*, 2020). Par ailleurs, l'équipe détecte la présence de lactonase,

pouvant hydrolyser et neutraliser les AHLs, dans neuf génomes issus de la base de donnée (Won *et al.*, 2020).

Un article datant de 2008 rapporte la présence d'AHLs dans les selles de quatre nouveau-nés à l'aide de rapporteurs bactériens (Kumari *et al.*, 2006, 2008).

La présence des AHLs dans l'intestin de mammifères repose donc sur des études bio-informatiques ou l'utilisation de rapporteurs bactériens, mais n'utilise pas de technique permettant l'identification directe des AHLs. Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'absence de publications apportant des preuves directes des AHLs « entériques ». Les AHLs peuvent être dégradées par de nombreux facteurs mentionnés précédemment et qui sont pertinents dans le cadre de l'intestin : un pH alcalin, la présence de PON, des acylases-oxidoréductases-lactonases bactériennes. De plus, il peut exister des verrous techniques, avec une limite de sensibilité notamment pour l'utilisation de rapporteurs bactériens.

C'est pourquoi les auteurs d'une revue se sont interrogés sur la présence des AHLs dans l'intestin : « *Are there Acyl-Homoserine Lactones within Mammalian Intestines?* » (Swearingen *et al.*, 2013). C'est la première question à laquelle notre équipe a voulu répondre (Landman *et al.*, 2018).

2. Identification de la 3-oxo-C12:2-HSL dans l'écosystème intestinal humain

Notre équipe a donc recherché la présence des AHLs dans l'écosystème intestinal de sujets sains, mais aussi de patients atteints de MICI. En effet, lors des MICI, la dysbiose implique un déséquilibre des bactéries du microbiote et donc il est possible d'émettre l'hypothèse d'une modulation des AHLs potentiellement présentes. Par ailleurs, plusieurs études activité de la PON1 et risque de développer une MICI (Boehm *et al.*, 2009; Karban *et al.*, 2007; Rothem *et al.*, 2007).

Afin de répondre à la question, notre équipe a mis au point une technique d'extraction des AHLs solide-liquide puis liquide-liquide et de détection par chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) (Landman *et al.*, 2018). Les fèces de 75 sujets ont été analysées : 26 sujet sains, 22 patients atteints de la MC, 27 patients atteints de RCH. Parmi les 49 patients, 24 sujets étaient en période de poussée et 25 étaient en rémission. **Quatorze AHLs ont pu être identifiées**, avec une distribution différente selon l'état pathologique des individus (Figure 22A). Parmi ces AHLs, l'une d'entre elle (**m/z 294.2**) était prédominante, elle était présente dans 40% des échantillons, soit 30 individus, tandis que les autres sont présentes dans moins de 10 échantillons. Grâce à la spectrométrie de

masse de haute résolution, il a été possible de déterminer sa masse précise, 294.1700 m/z, et donc sa formule : C₁₆H₂₄O₄N (Figure 22B). Notre équipe en a déduit que cela correspondait à une AHL avec une chaîne de 12 carbones avec deux insaturations, nommé **3-oxo-C12:2-HSL**, molécule qui n'avait jusqu'alors jamais été décrite (Tableau 5). La position précise de ses doubles liaisons n'a pas pu être déterminée en raison de la faible quantité de produit extrait mais a été déterminée par analyse de la bibliographie scientifique. Après synthèse chimique, l'activité QS de la 3-oxo-C12:2-HSL a pu être vérifiée grâce à un système rapporteur bactérien.

La structure de cette molécule est donc très proche de celle de la 3-oxo-C12-HSL de *Pseudomonas aeruginosa*, avec deux insaturations en plus. La présence d'une double insaturation de la chaîne carbonée d'une AHL est très peu rapportée mais un article décrit la présence d'une AHL avec une chaîne de 12 carbones ayant deux doubles liaisons, produite par des bactéries marines du genre *Roseobacter* (Ziesche *et al.*, 2019). Sans pouvoir déterminer de façon précise la localisation des insaturations, cette équipe a synthétisé plusieurs molécules candidates. L'article conclue que la configuration et stéréochimie des insaturations a peu d'importance dans la signalisation bactérienne (Ziesche *et al.*, 2019).

Des différences de distribution de la 3-oxo-C12:2-HSL parmi les individus de l'étude ont été observées. En effet, cette molécule est diminuée chez les patients atteints de MICI en période de poussée (16% sont positifs à la 3-oxo-C12:2-HSL) et en période de rémission (37,5% sont positifs à la 3-oxo-C12:2-HSL)) comparé à des sujets sains (65,4% sont positifs à la 3-oxo-C12:2-HSL)) (Figure 22C). D'un point de vue quantitatif, on note une concentration plus faible de 3-oxo-C12:2-HSL dans les selles de sujets en période active de la maladie (en moyenne 0,25 nmol/g fèces) par rapport aux sujets sains (en moyenne 2,62 nmol/g fèces) (Figure 22D).

Par ailleurs, l'absence de la 3-oxo-C12:2-HSL est corrélée à un état de dysbiose, avec une diminution des bactéries du phylum Firmicutes (en particulier les *Clostridium*, dont *Faecalibacterium prausnitzii*) et une augmentation des d'*Escherichia coli* par rapport aux individus possédant l'AHL (Figure 22E).

La 3-oxo-C12:2-HSL exerce en outre des effets anti-inflammatoires de façon dose-dépendante sur la lignée de cellules épithéliales intestinales Caco-2/TC7 (Figure 22F). De plus de façon très intéressante, à l'état basal, cette molécule n'augmente pas la perméabilité paracellulaire aux macromolécules, contrairement à la 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa* (Figure 22G). Cette étude a donc mis en évidence, pour la première fois, la présence d'AHLs dans l'écosystème intestinal humain, dont une est prédominante, la 3-oxo-C12:2-HSL. De plus, il a été possible de corréler l'absence de cette molécule à un état pathologique.

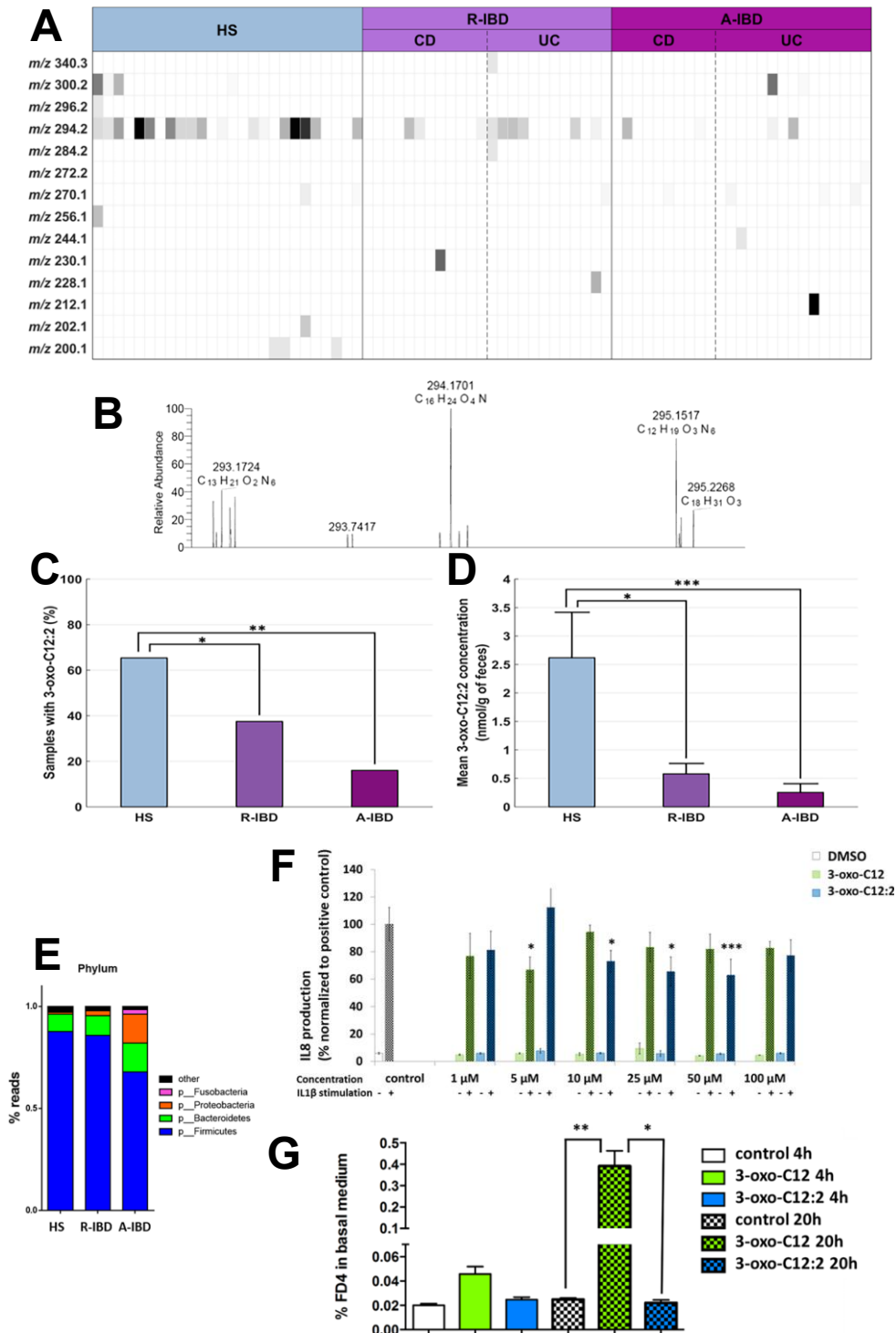


Figure 22 : Mise en évidence de la 3-oxo-C12:2-HSL dans l'écosystème intestinal humain

A : Heatmap du profil des Acyl-Homoserine Lactones (AHLs) dans les fèces des sujets sains (HS), les patients MICI en rémission (R-IBD) et des patients MICI en période de poussée (A-IBD). Les AHLs sont désignées par leur masse sur charge (m/z) et sont représenté par des rectangles, le plus foncée désignant une forte concentration au plus clair, une faible concentration. L'AHLs $m/z = 294.2$ est la 3-oxo-C12:2-HSL **B** : Full Scan (80-100) de la fraction contenant la 3-oxo-C12:2-HSL ($m/z = 294.2$) **C et D** : Graphique représentant la distribution et la concentration de la 3-oxo-C12:2-HSL dans les fèces parmi les sujets. **E** : Composition bactérienne dans les fèces des sujets de l'étude à l'échelle du phylum. **F** : Sécrétion de l'interleukine-8 (IL-8) par les cellules épithéliales Caco-2/TC7 stimulées ou non par de l'IL-1 β , et traitées par la 3-oxo-C12-HSL ou 3-oxo-C12:2-HSL aux concentrations indiquées, illustrant les effets anti-inflammatoires de la 3-oxo-C12:2-HSL comparés à ceux de la 3-oxo-C12-HSL **G** : Effet des 2 AHLs sur la perméabilité aux macro-molécules après 4h ou 20h d'exposition aux AHLs. Proportion de FD4-FITC dans le compartiment basal des cellules Caco-2/TC7 cultivées sur transwell. Les cellules ont été exposées à 200 μ M d'AHL. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. *adapté de Landman et al., 2018*

3. Modulations chimiques d’AHLs ayant des effets optimisés

Cette AHL nouvellement mise en évidence dans l’intestin constitue une piste prometteuse dans la mise au point de nouvelles molécules anti-inflammatoires. On peut donc l’envisager comme un modèle pour le développement de molécules d’intérêt thérapeutique.

L’utilisation d’analogues synthétique des AHLs a été adoptée notamment dans le but de créer de nouvelles alternatives aux antibiotiques, comme le rapporte de manière extensive Christiane Chbib (Chbib, 2020). Ce travail est en grande majorité mené contre la bactérie pathogène *P. aeruginosa*, à partir de son AHL 3-oxo-C12-HSL. Chhabra et son équipe ont démontré que l’ajout d’une double liaison ou d’un substitut non polaire au bout de la chaîne aliphatique avait des effets immunosuppresseurs, tandis que la modification du noyau lactone ou l’ajout de substitut polaire supprimait les effets de l’AHL synthétique (Chhabra *et al.*, 2003). La nécessité du noyau lactone intact a été confirmé par une autre étude (Kravchenko *et al.*, 2006). En son absence, la signalisation de la 3-oxo-C12-HSL synthétique est abolie par rapport à son analogue naturel. De plus, une chaîne aliphatique longue est nécessaire pour que la molécule exerce des effets sur les cellules eucaryotes (Tateda *et al.*, 2003).

Des études rapportent également la modulation de structure des AHLs avec comme objectif de trouver des **molécules anti-inflammatoires** (Thomas *et al.*, 2006). Ainsi, notre équipe a, en collaboré avec l’équipe de Jean-Maurice Mallet de l’ENS. Agathe Peyrottes, doctorante dans l’équipe du Dr. Maller, a synthétisé au cours de sa thèse plusieurs **analogues**, dont certaines ont fait l’objet d’un brevet (PAT2602795PC00). Cette molécule, dénommée **3-oxo-C12-2-Amino-4-ChloroPhénol (ACP)** possède un noyau phénol à la place du noyau lactone ainsi qu’une fonction chlore et phénol (Tableau 5) (Peyrottes *et al.*, 2020). Cette molécule possède des effets anti-inflammatoires plus forts que la 3-oxo-C12:2-HSL sur des modèles de macrophages murins et de cellules épithéliales intestinales. Par ailleurs, elle n’active pas le récepteur bactérien à la 3-oxo-C12-HSL (contrairement à la 3-oxo-C12:2-HSL), ce qui est un avantage étant donné que ce sont des récepteurs majoritairement décrits dans les bactéries pathogènes. Enfin, cette molécule possède une plus grande stabilité et est insensible aux lactonases sécrétées par l’hôte.

OBJECTIFS

La 3-oxo-C12:2-HSL est une nouvelle AHL, identifiée dans l'écosystème intestinal humain et diminuée chez les sujets atteints de MICI par rapport à des sujets sains. Notre équipe a abordé l'étude des propriétés de cette molécule potentiellement mise en jeu dans le dialogue hôte-microbiote par différents angles ; (i) ses effets sur la barrière intestinale, (ii) sur l'inflammation et sur la composition du microbiote et (iii) la recherche d'analogues. Ce dernier axe a fait l'objet d'une collaboration avec une équipe de chimistes qui a permis la synthèse d'analogues à visée thérapeutique.

L'absence de 3-oxo-C12:2-HSL étant corrélée à un état inflammatoire chez les patients, il était primordial d'étudier son implication dans l'inflammation intestinale. **Les objectifs de mon travail de thèse ont donc été de caractériser les effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur l'inflammation intestinale et d'identifier les mécanismes mis en jeu, mais aussi d'étudier les effets sur la composition du microbiote.** J'ai abordé cette question sur des modèles *in vitro* de cellules immunitaires et de cellules épithéliales, ainsi qu'*in vivo* dans un modèle de colite expérimentale chez la souris.

En parallèle, j'ai pu participer au développement des autres angles de recherche sur la 3-oxo-C12:2-HSL. J'ai ainsi pris part aux travaux de thèse de Doriane Aguanno, portant sur les effets de la 3-oxo-C12:2-HSL et de la 3-oxo-C12-HSL sur la fonction de barrière intestinale, dans un contexte d'inflammation. J'ai ainsi participé aux expériences d'analyse de la perméabilité *in vitro* et *in vivo*. Ce travail, dont je suis 2^{ème} auteure a fait l'objet d'une publication (Aguanno *et al*, 2020), présenté dans la partie « Résultats ». Par ailleurs, j'ai participé au screening des analogues d'AHLs synthétisés par une autre doctorante de l'équipe, Agathe Peyrottes. Une publication, à laquelle j'ai activement participé, a résulté de ce travail (Peyrottes *et al*, 2020) et est présenté en annexe. Une des molécules s'est révélée prometteuse et a fait l'objet d'un dépôt de brevet. Nous avons donc intégré au cours de ma thèse, l'étude de l'ACP, AHL synthétique, à l'étude la 3-oxo-C12:2-HSL, molécule naturelle.

Lors de mon doctorat, j'ai également eu l'opportunité de participer à la rédaction de plusieurs revues présentées en annexe. La première est un article publié dans le journal médical « La revue du praticien » et intitulé « Quel est le rôle du Microbiome dans les MICI ? ». Lors du confinement lié au Covid-19, j'ai pu mettre à profit le temps hors du laboratoire pour mener la rédaction d'une seconde revue intitulée « *Impact of N-Acyl-Homoserine Lactones, Quorum Sensing Molecules, on Gut Immunity* » (Coquant *et al*, 2020). Un troisième article de revue m'a

OBJECTIFS

permis d'aborder le Quorum Sensing plus largement, au-delà des AHLs ; cette revue intitulée « *Gossip in the gut: Quorum Sensing, a new player in host-microbiota interactions* » est actuellement sous presse (Coquant *et al*, 2021).

Mon travail de thèse a été financé par la Fondation pour la Recherche Médicale pendant trois ans et prolongé de trois mois par Sorbonne Université.

RESULTATS

L'objectif général de ce projet était de décrire les effets de la 3-oxo-C12:2-HSL, sur l'homéostasie intestinale, dans un contexte de pathologie inflammatoire. En parallèle, nous avons étudié les effets d'un analogue synthétique aux AHLs, l'ACP, afin de mieux caractériser ses effets.

Les résultats sont présentés en deux parties. La première partie, traitant des effets de la 3-oxo-C12:2-HSL, comprend un article soumis à Scientific Report qui décrit des effets anti-inflammatoires mettant en la voie JAK-STAT ainsi que l'interaction de l'AHL avec les récepteurs du goût amer, et un article publié dans Tissue Barriers, qui montre que la 3-oxo-C12:2-HSL protège les jonctions serrées des entérocytes du démantèlement induit par des cytokines pro-inflammatoires. Des résultats complémentaires que nous n'avons pas inclus dans ces publications sont également présentés.

Les effets *in vitro* de l'ACP sont présentés dans une deuxième partie. Nous avons observé que cette molécule analogue exerçait des effets anti-inflammatoires puissants sur les modèles de cellules immunitaires. Néanmoins, nous n'avons pas identifié l'implication des mêmes mécanismes de signalisation que ceux observés avec la 3-oxo-C12:2-HSL. Nous avons également étudié les effets de l'ACP *in vivo* dans un modèle murin de colite.

I- Effets de la 3-oxo-C12:2-HSL, molécule naturelle, sur l'homéostasie intestinale

A. La 3-oxo-C12:2-HSL, molécule du Quorum Sensing du microbiote intestinal humain, inhibe l'inflammation dans les cellules immunitaires via les récepteurs du goût amer (Article principal)

D'une part nous avons exploré l'impact de ces molécules sur des modèles de lignée *in vitro*, principalement sur des macrophages murins RAW264.7, ainsi que sur des cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cell* - PBMC). Nous avons pu démontrer que la 3-oxo-C12:2-HSL diminue la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires : TNF α et IL-1 β . L'AHL exerce des effets anti-inflammatoires sur les cellules immunitaires, en prévenant l'activation de la voie JAK-STAT, centrale dans l'inflammation. De plus, nous avons mis en évidence l'implication des récepteurs du goût amer dans la signalisation de l'AHL naturelle. Ces résultats *in vitro* sont présentés sous forme d'un article en cours de soumission au journal *Scientific reports*.

**3-oxo-C12:2-HSL, Quorum Sensing molecule from human intestinal microbiota,
prevents pro-inflammatory pathway activation in immune cells *via* bitter taste receptors**

Garance Coquant¹, Doriane Aguanno^{1,2}, Loïc Brot¹, Christine Belloir³, Julie Delugeard¹,
Nathalie Roger¹, Phuong Pham⁴, Loïc Briand³, Luisa De Sordi¹, Véronique Carrière¹, Jean-
Pierre Grill¹, Sophie Thenet^{1,2}, Philippe Seksik^{1,5*}

¹Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, INSERM UMRS 938, Paris, France,
²EPHE, PSL University, Paris, France, ³Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR
1324 INRAE, UMR 6265 CNRS, University of Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon,
France, ⁴Parean Biotechnologies, Saint Malo, France, ⁵Département de Gastroentérologie et
Nutrition, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

*Corresponding author(s): philippe.seksik@sat.aphp.fr

Abstract

In gut ecosystem, micro-organisms regulate group behaviors and interplay with host via a molecular system termed quorum sensing (QS). The QS molecule 3-oxo-C12:2-HSL, discovered in human gut microbiota, exerts anti-inflammatory effects and could play a role in inflammatory bowel diseases where dysbiosis has been described. We aimed at identifying which signalling pathways are involved in this effect. We observed that 3-oxo-C12:2-HSL decreases pro-inflammatory cytokines expression, Interleukine-1 β (-35 %) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) (-40 %) by stimulated immune RAW264.7 cells and decreases TNF α secretion in a dose-dependent manner, between 25 μ M to 100 μ M, by stimulated PBMC. Transcriptomic of RAW264.7 cells exposed to 3-oxo-C12:2-HSL, in a proinflammatory setting, pointed out JAK-STAT, NF- κ B and TNF signalling pathways and we could confirm *in vitro* inhibition of JAK1 and STAT1 phosphorylation by 3-oxo-C12:2-HSL. We also showed through a screening and then an inhibition assay that 3-oxo-C12:2-HSL interacted with several human bitter taste receptors. Its anti-inflammatory effect involved T2R38 interaction and led to an increase in intracellular calcium level. We thus demonstrated anti-inflammatory effect exerted by QS molecule 3-oxo-C12:2-HSL and revealed involved cellular pathways.

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are chronic relapsing inflammatory conditions of the gastrointestinal tract leading to bowel damages and increased intestinal cancer risk¹. The incidence and prevalence of CD and UC is increasing and estimated 0.3% of the European population suffers from IBD equalling 2.5–3 million persons². IBD, which affects young adults and lasts a long time, account for substantial costs to the health care system and society. Disease management have changed significantly in the last decade with the use of parenterally administrated biologic agents and new oral small molecules such as pan-Janus kinase (JAK) inhibitor³. Those are used more widely and earlier in the disease course¹. However, this strategy is not always effective, quite expensive and expose patients to adverse effects, mainly serious infections and malignancy⁴. Thus, there is a place for more “gut restricted” and physiological therapeutic approaches mostly based on gut microbiota knowledge.

Indeed, gut microbiota has been strongly implicated in the pathogenesis of IBD^{5,6} where microbial unbalance (dysbiosis) has been described⁷. Thus microbiota-based treatments, such as faecal microbiota transplantation, are being studied^{8,9}. In this setting, investigating gut microbiota derived molecules remains an attractive way to control gut inflammation and prevent IBD flares. In fact, gut microbiota mutually interacts with co-evolved host epithelial and immune cells in a beneficial reciprocal relationship and host-microbiota interactions drive inflammatory responses as dysbiosis alters microbial metabolites production¹⁰⁻¹³. A largely overlooked metabolite component is that of diffusible signal molecules represented by bacterial quorum sensing (QS) molecules, called autoinducers¹⁴. Acyl-Homoserine Lactones (AHL) are a class of autoinducers that can have an impact on the host, as part of the inter-kingdom signalling¹⁴. Our team identified for the first time several AHL in the gut ecosystem, and among them, the most prominent was the 3-oxo-C12:2-HSL, a molecule that had never been described¹⁵. 3-oxo-C12:2-HSL was decreased in IBD patient compared to healthy subjects and its presence was correlated to normobiosis¹⁵. 3-oxo-C12:2-HSL is structurally close to 3-oxo-C12-HSL synthesized by *Pseudomonas aeruginosa*, a molecule well characterised in the literature. We previously described anti-inflammatory effects of 3-oxo-C12:2-HSL on intestinal epithelial cells Caco-2/TC7 stimulated by interleukin- β , in a dose-dependent way¹⁵. In addition, we demonstrated that 3-oxo-C12:2-HSL protect tight junctions' disruption induced by pro-inflammatory cytokines and thus has a beneficial role on intestinal barrier function¹⁶. In the

RESULTATS : EFFETS DE LA 3-OXO-C12 :2-HSL, MOLECULE NATURELLE, SUR L'HOMEOSTASIE INTESTINALE

present study, we aim at characterising the effects of 3-oxo-C12:2-HSL on cell inflammation and identifying cellular target of the autoinducer. Using immune cell line RAW264.7 as well as peripheral blood mononuclear cell (PBMC) stimulated lipopolysaccharides (LPS) and interferon- γ (IFN γ), we assessed how 3-oxo-C12:2-HSL modulates host-inflammatory response and the mechanisms involved. The AHL exerted anti-inflammatory effects by down-regulating pro-inflammatory cytokines secretion. By transcriptomic analysis, we identified several pathways involved and one in particular, the JAK-STAT pathway. 3-oxo-C12:2-HSL was able to prevent from JAK-STAT signalling activation. We also identified a potential receptor for this AHL, known as bitter taste receptors.

Results

3-oxo-C12:2-HSL decreases pro-inflammatory cytokine expression and secretion by immune cells

We first observed the effect of 3-oxo-C12:2-HSL on immune cell inflammation. We exposed RAW264.7 murine macrophages cells to lipopolysaccharides (LPS) and Interferon- γ (IFN γ) in order to trigger a M1 classical macrophage activation¹⁷. Cells were treated with 50 μ M of 3-oxo-C12:2-HSL and we measured secreted cytokines from the supernatant (Fig. 1 a, b, c). Secreted pro-inflammatory Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) (-40 %, Fig. 1a) and Interleukine-1 β (IL-1 β) (-35 %, Fig. 1b) were decreased in presence of 3-oxo-C12:2-HSL compared to the control. We then investigated the effects on inflammation at the transcript level. mRNA levels of the two cytokines mentioned above were also reduced in macrophages exposed to 3-oxo-C12:2-HSL, in the same order of magnitude as the protein (Fig. 1c, d). Anti-inflammatory cytokine IL-10 expression was strongly increased when cells were exposed to the AHL (Fig. 1e).

In order to confirm those results in a more physiological model, we tested the impact of the AHL on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from healthy donors. Inflammation was triggered with LPS (10 ng/mL), and we exposed PBMC to an increasing dose of 3-oxo-C12:2-HSL. We measured TNF α secretion, it was strongly decreased in a dose-dependent manner, between 25 μ M to 100 μ M (Fig.1f).

To note, cytotoxicity was monitored through lactate dehydrogenase release for all experiments and no significant difference from the control was observed for the used doses (Supplementary Fig.1).

3-oxo-C12:2-HSL modulates gene expression in RAW264.7 cells

With the aim of understanding the mechanisms behind 3-oxo-C12:2-HSL immunomodulatory effects on immune cells, we performed an analysis of the RAW264.7 transcriptome exposed to 3-oxo-C12:2-HSL in a proinflammatory setting. We observed that 3-oxo-C12:2-HSL down-regulated 736 genes and up-regulated 1140 genes compared to the control cells treated with DMSO (Figure 2a).

Differential expressed genes were analysed by Gene Ontology (GO) (Fig. 2b). The higher down-regulated terms were “immune system process”, “innate immune response” and “inflammatory response”, reflecting the anti-inflammatory effects of 3-oxo-C12:2-HSL

observed in Figure 1. Moreover, we could identify biological processes involved in inflammation signalling and among them the most represented that were downregulated were NF- κ B (5 terms) and Toll Like Receptor (TLR) (2 terms) signalling pathways but also the TNF signalling pathway (3 terms). The latter correlated with the decrease of TNF α protein secretion observed in Figure 1a and g.

We also analysed differential expressed genes by KEGG pathways (Fig. 2c). A high number of pathways were modulated by the AHL (Supplementary Fig. 2), we therefore selected pathways related to inflammation and IBD, as displayed on Figure 2c. Some of the crucial pathways in inflammation signalling were down-regulated, such as “JAK-STAT signalling pathway”, “NF- κ B signalling pathway” and the “TNF signalling pathway”. Several cluster of genes related to inflammation were down-regulated by 3-oxo-C12:2-HSL, for instance “apoptosis”. Interestingly, 3-oxo-C12:2-HSL differentially down-regulated genes related to IBD. Moreover, 3-oxo-C12:2-HSL was able to down-regulate the ABC pathways, as opposed to *P. aeruginosa*'s 3-oxo-C12-HSL who is able to up-regulate the expression of the ABC receptors¹⁸.

From both GO and KEGG pathway analysis, we were able to identified specific cellular pathways involved in the signalling of 3-oxo-C12:2-HSL. We chose to specifically study one lead: the JAK-STAT signalling pathway.

3-oxo-C12:2 prevents the activation of the JAK-STAT pathway

In order to explore the effects of 3-oxo-C12:2-HSL on the JAK-STAT pathway, we analysed the phosphorylation level of proteins involved in the pathway. As this pathway is composed of different isoforms of the proteins, we studied several of them in RAW264.7 macrophages activated by LPS and IFN γ . When cells were treated with the pro-inflammatory cocktail, we observed an increase of the phosphorylation of the pathway (Fig3a, b, c, d, e). When exposed to 3-oxo-C12:2-HSL in combination of LPS and IFN γ , phosphorylation of JAK1 (-50%) and STAT1 (-40%) was lower than the control (Fig3a and b). on the contrary, JAK2 and STAT3 phosphorylation level was not significantly changed upon exposure to 3-oxo-C12:2-HSL.

Those results demonstrate that 3-oxo-C12:2-HSL prevents the activation of the JAK-STAT pathway, by specifically reducing the phosphorylation of JAK1 and STAT1 proteins.

3-oxo-C12:2-HSL interacts with bitter taste receptors

To identify potential eukaryotic receptors, we adopted a targeted approach. As 3-oxo-C12:2-HSL chemical structure is close to 3-oxo-C12-HSL synthesized by *P. aeruginosa*, we hypothesized that 3-oxo-C12:2-HSL can interact with the bitter taste receptor T2R38. Bitter taste receptors are G protein-coupled receptor and their role beyond oral taste is the subject of numerous studies in the last decade¹⁹. Taste receptors are expressed all along the digestive tract²⁰⁻²³, but also by immune cells²⁴⁻²⁶.

We exposed RAW264.7 cells to Probenecid, a known allosteric inhibitor of T2R38^{27,28} (Fig. 4a). When exposed to the inhibitor and 3-oxo-C12:2-HSL in a pro-inflammatory context, a higher amount of TNF α is secreted compared to cells exposed only to 3-oxo-C12:2-HSL. This shows that when T2R38 is inhibited, 3-oxo-C12:2-HSL anti-inflammatory effect is abolished. In order to elucidate if 3-oxo-C12:2-HSL was able to activate other bitter taste receptors, we screened 25 known human bitter taste receptors in reporter-cells (Fig. 4b). Among these bitter taste receptors²⁹, the AHL was able to activate several GPCR: T2R1, T2R8, T2R10, T2R13, T2R14, T2R38. T2R8 ($EC_{50}=333 \pm 27 \mu M$), T2R1 ($EC_{50}=496 \pm 38 \mu M$) and T2R14 ($EC_{50}=693 \pm 2 \mu M$) have the highest half effectiveness concentration (EC_{50}), translating the highest potency of 3-oxo-C12:2-HSL, while T2R10 ($EC_{50}=438 \pm 120 \mu M$) and T2R38 ($EC_{50}=476 \pm 125 \mu M$) exhibited a lower EC_{50} . No response was detected at concentration below 250 μM . Transduction of taste signalling results in the opening of IP3R-dependant calcium channels and the intracellular release of Ca²⁺¹⁹. Therefore, we investigated the effect of 3-oxo-C12:2-HSL with a Fluo-4 probe, at basal state. Thapsigargin was used as a positive control. We observed an increase in intracellular calcium level when RAW264.7 cells were exposed to 3-oxo-C12:2-HSL compared to the control (Fig. 4c and d). The response was lower than the one observed with thapsigargin, however the slope of the curve was significantly higher than observed with the control condition (Fig. 4d).

Discussion

As the human gut is one of the most densely populated ecosystem, the study of QS molecules in this environment seems legitimate. AHLs are the most studied QS auto-inducers and our team identified a never-described one in the gut ecosystem, 3-oxo-C12:2-HSL¹⁵. Our initial work showed that 3-oxo-C12:2-HSL correlated with normobiosis and was less found in IBD associated dysbiosis. Our group observed that this molecule decreased IL-8 production by the intestinal epithelial cell line Caco-2/TC7 stimulated by IL-1 β ¹⁵, we therefore aimed at investigating how 3-oxo-C12:2-HSL can modulate inflammatory response of immune cells. Here, we demonstrate that 3-oxo-C12:2-HSL exerts anti-inflammatory effects on immune cells by preventing JAK-STAT pathway activation and by activating bitter taste signalling.

AHL have been described to modulate host's immunity, in particular 3-oxo-C12-HSL from *Pseudomonas aeruginosa*, structurally close to 3-oxo-C12:2-HSL. In a number of study, the AHL downregulated cytokine secretion by macrophages³⁰⁻³², dendritic cells³³, T lymphocytes^{30,34,35} as well as epithelial cells^{15,36}. In the present study, 3-oxo-C12:2-HSL displays similar effects, by downregulating secretion of pro-inflammatory cytokine TNF α and IL-1 β , as well as their respective gene expression by RAW264.7 murine macrophages. Interestingly, this AHL was also able to increase anti-inflammatory cytokine IL-10 expression, suggesting a powerful anti-inflammatory effect in immune cells. Those results were confirmed using a more physiological model, PBMC stimulated by LPS, where TNF α was strongly decreased by 3-oxo-C12:2-HSL exposure, in a dose-dependent manner. We activated RAW264.7 cells with LPS and IFN γ , leading the macrophages to a M1 profile¹⁷, similar to what is observed during IBD physiopathology. Indeed, in the mucosa of patients, there is an influx of pro-inflammatory macrophages³⁷. In those conditions, the JAK-STAT pathway activation is enhanced, with a particular involvement of the protein STAT1³⁸⁻⁴⁰. Our AHL of interest was able to prevent JAK1 and STAT1 phosphorylation and this result is particularly relevant in the field of IBD. Indeed, 3-oxo-C12:2-HSL is decreased in IBD patients¹⁵ and remains a microbial product able to reach IBD pathways involved in chronic inflammation. Novel IBD therapeutic are targeting the JAK proteins⁴¹. Current drugs in IBD are targeting one or several cytokines (such as anti-TNF)⁴¹ whereas new oral small molecules act by inhibiting pan-JAK or specific JAK pathways. However, clinical trials on JAK inhibitors revealed serious adverse events. Alternative approaches using gut restricted molecule is appealing with drugs exerting a strong anti-inflammatory effect while being less prone to side effects. The use of AHL as modulators

of gut inflammation is thus an interesting and promising path. Moreover, 3-oxo-C12:2-HSL was shown to stabilize proteins involved in gut barrier¹⁶, counterbalancing leaky gut observed in IBD. Altogether, those results pave the way for future therapeutic development of this type of molecule. In this setting, investigating mechanisms of action by which an AHL signal its effect on epithelial cells and immune cells remains crucial. To further our results we need to focus on this pathway and explore how this molecule is able to prevent phosphorylation of JAK1 and STAT1 proteins.

Interkingdom effects of AHL raises the question of eukaryotic AHL receptors. Some proteins were identified as target of 3-oxo-C12-HSL from *P. aeruginosa*: the scaffolding protein IQGAP1⁴², the aryl hydrocarbon receptor (AhR)⁴³, PPAR γ ^{44,45}, the bitter taste receptor T2R38^{24,46-48}. The latter raised our curiosity as bitter taste receptors are getting interest, particularly in their extra-oral expression¹⁹. In this study, we demonstrate that T2R38 signalling is needed for 3-oxo-C12:2-HSL to exert anti-inflammatory effects on immune cells. Taste receptor signalling, through the second messenger IP3, activate the release of calcium of the endoplasmic reticulum¹⁹. We demonstrated that 3-oxo-C12:2-HSL is able to induce calcium flux in RAW264.7 macrophages, adding a proof in the hypothesis that 3-oxo-C12:2-HSL signals through taste receptors. In addition, we did a screening of all the human bitter taste receptors and we identified six that were activated in presence of the AHL of interest. Among them, some have numerous known ligands, such as T2R14 which can bind to more than 150 compounds while others only have two known synthetic ligands like T2R13, according the database BitterDB⁴⁹. Advances in knowledge of BTR involvement in inflammatory pathways are needed to link our findings with AHLs signalling in immune cells.

One could imagine that 3-oxo-C12:2-HSL also exerts effect on gut microbial communities at a scale of the gut microbiota. We could make the hypothesis that 3-oxo-C12:2-HSL participates to gut normobiosis. The group of Karina Bivar Xavier showed that universal QS molecule, AI-2, was able to recapitulate gut microbiota after antibiotic challenge *in vivo*. AI-2 was delivered by modified *E. coli* and increased Firmicutes proportions of the microbiota. In the same way, the role of 3-oxo-C12:2-HSL in shaping gut microbiota needs to be investigated. Effect induced in the gut microbiota could be additive to the effects on host cells. In the present study, we restricted our investigation on effect on immune host cells. Our results could be added to those observed on gut microbiota population once those effect will be revealed.

Our work is part of an innovative approach to the role of QS molecules on host cells outside the interaction with a pathogenic bacterium. Our results provide a first set of data in this field. We propose a model for the effect of 3-oxo-C12:2-HSL on immune cells (Fig5). 3-oxo-C12:2-

RESULTATS : EFFETS DE LA 3-OXO-C12 :2-HSL, MOLECULE NATURELLE, SUR L'HOMEOSTASIE INTESTINALE

HSL is able to activate bitter taste receptors, which results in the release of calcium from the endoplasmic reticulum. Besides, 3-oxo-C12:2-HSL prevents from the activation of the JAK-STAT pathways in activated macrophages by specifically preventing the phosphorylation of JAK1 and STAT1. Our model sets the basis for the effects induced by this molecule. We feel confident that a molecule found in a regular ecosystem should not provide toxicity and could represent an ecological immune-modulator. Finally, 3-oxo-C12:2-HSL effect on immune cells highlights the role of this type of molecule in pathophysiology of puzzling diseases such as IBD where dysbiosis drives gut inflammation. Investigating QS molecules and their interkingdom effect remains therefore an unquestionable quest when searching for links between inflammation and gut microbiota.

Methods

Cell culture

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were extracted from whole blood of anonymous donor and collected by *Etablissement Français du Sang* of Paris, France.

RAW264.7 murine macrophage cells (ATCC, Manassas, Virginia, USA) were cultured between passage 12 and 25 in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 1% L-glutamine (ThermoFisher Scientific). The macrophages were seeded at 35,000 cells per well in 12-well plates (Falcon) for ELISA experiments or 110,000 cells per well in 6-well plates (Falcon) for cell lysates, upon reaching 80–90 % confluence after 3-day culture. The cells were maintained at 37 °C with 5 % CO₂/air atmosphere and the media were changed every other day.

Human Peripheral Blood Mononuclear Cell isolation

Peripheral blood was harvested in EDTA tubes, blood was diluted with PBS 1:1, layered over Histopaque-1077® (Sigma) and centrifuged for 20 min at 400 g at room temperature. Extracted PBMC were washed twice with sterile PBS then centrifuged at 300 g for 5 min and resuspended in complete medium. PBMC were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (ThermoFisher Scientific) with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1 % L-glutamine, 1 % non-essential amino acids, 1 % sodium pyruvate, penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (100 µg/ml). For experiments, cells were seeded at 300,000 cells per well in 200 µL of medium in 96-well plates (ThermoFisher Scientific).

Cell Treatments

Cells were exposed to 3-oxo-C12:2-HSL (synthesized as previously described¹⁵ or DMSO 0.1% as a control for different duration depending on the experiment, in the presence of the lactonase inhibitor 2-hydroxyquinoline (100 µM, Sigma-Aldrich), in order to limit the hydrolysis of the AHL lactone ring.

In RAW264.7 cells, inflammation was triggered with LPS (10 ng/mL, Sigma) and IFN γ (10 U/mL, R&Dsystems). PBMC were exposed to LPS (10 ng/mL) and AHL for 24 hours. For T2R38 inhibition experiments, cells were exposed to T2R38 allosteric inhibitor probenecid (1 mM, Sigma) for one hour before adding AHLs and the inflammatory cocktail, without changing the media.

Lactate dehydrogenase release

Lactate Dehydrogenase release in the medium was used as a reflection of cellular toxicity. LDH concentration was measured using the Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Boulogne-Billancourt, France) according to the manufacturer's instructions. The media were centrifuged

RESULTATS : EFFETS DE LA 3-OXO-C12 :2-HSL, MOLECULE NATURELLE, SUR L'HOMEOSTASIE INTESTINALE

5min at 250 g to remove any cells. 50 µL of reaction mixture was added to 50 µL of media supernatant per 96-well. After 10min at room temperature, 25 µL of stop solution was added. Absorbance at 490 nm was determined with a microplate spectrometer (FLUOstar Omega; BMG Labtech). Results are expressed as absorbance arbitrary units.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

After incubation, the medium was centrifuged at 300g for 5min at 4°C. supernatant was frozen at -80 °C until ELISA assays. ELISA kits were purchased from R&D systems and performed according to manufacturer's instructions. Briefly, plates were coated with capture antibody and incubated overnight. Wells were blocked using 1% bovine serum albumin-PBS solution (Sigma), then exposed for two hours to the cell supernatants. Wells were washed and incubated with detection antibody for two more hours. After thorough washing, Streptavidin-HRP solution was added for 20 min. Wells were washed one last time, then incubated with TMB (Biolegend) solution for 20 min and the reaction was stopped using H₂SO₄. Absorbance was measured by a spectrometer (FLUOstar Omega; BMG Labtech) at 450nm and the absorbance at 540 nm was subtracted.

RNA extraction for RNA sequencing

After two hours of incubation, cells were washed one with PBS and RNA was extracted using RNeasy minikit (Qiagen). Briefly, cells were lysed and 1 volume of ethanol was added. The sample was transferred into a spin column and centrifuged at 8,000 g for 15 sec. The column was washed several times and then eluted with water. RNA quality was assessed using NanoChip (Agilent) on a chip reader (Bioanalyzer 2100, Agilent)

mRNA sequencing

After extraction, total RNA were qualified with AGILENT tapeStation 2200. mRNA library preparation was realized following manufacturer's recommendations (KAPA mRNA HyperPrep Kit from ROCHE). Final samples pooled library prep were sequenced on ILLUMINA Novaseq 6000, corresponding to 2x28 Millions of 100 bases reads per sample after demultiplexing.

RNA-Seq data analysis workflow

fastQC v 0.11.9⁵⁰ was used for the quality control of raw paired-end fastq data set. Illumina's adapters were removed from reads using cutadapt v2.10⁵¹. Trim_galore v0.6.4⁵² was used to trim bad quality bases (Phred < 20). Salmon v 1.4.0⁵³ was used to quantify paired-end reads against a mapping-based index built from the Ensembl GRCm38 transcript set for all samples. Downstream analysis was handled in R platform v4.0.2⁵⁴ and its add-on packages. Quantified transcripts were imported into R using the package tximport v1.16.1⁵⁵. Gene-level

DESeqDataSet object was built from previously imported transcript level abundances using the package DESeq2⁵⁶ in order to perform the differential expression analysis. A pre-filtering was applied to remove genes having less than 5 counts in one sample. For visualisation, raw counts were transformed by the “variance stabilizing transformation” method implemented in the package DESeq2. To obtain the overview in term of the between sample variability, Principal Component Analysis was performed on variance stabilizing transformation and normalised count dataset using the package ade4 v 1.7-16⁵⁷. Differential expression analysis was performed by the function DESeq of the package DESeq2. Briefly, the size factor was estimated for each sample, the dispersion was estimated for each gene, counts were fitted to a Negative Binomial Generalized Linear Model and Wald's test was performed for testing the difference of expression between biological conditions. Benjamini-Hochberg's method⁵⁸ was used for controlling the False-discovery rate (FDR). Significant level was fixed at type I error $\alpha = 0.01$. Volcano plots were used to display the results of differential analysis using the package ggplot2 v3.3.3⁵⁹. All significant gene lists were annotated for enriched biological functions and pathways using the DAVID platform through the package RDAVIDWebService v1.28.0⁶⁰ for gene ontology⁶¹ and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes terms⁶². Significant terms had adjusted p-value, according to the Benjamini-Hochberg's method, below 0.05. In addition to the traditional gene by gene analysis, count dataset was analysed at KEGG pathway level using the package Ensemble of Gene Set Enrichment Analysis (EGSEA) v1.16.0⁶³ that combines results from twelve algorithms to improve the biological relevance of the pathways. Thus, significant pathways had adjusted p-value below 0.01. Gene expression heatmaps were produced by the package pheatmap v1.0.12⁶⁴. We used Venn diagrams to globally visualize the overlap between all significant genes as well as all significant pathways in the biological condition comparisons.

Determination of protein levels by WesTM capillary electrophoresis

RAW264.7 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). WesTM 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ protein, primary antibodies (as detailed below), and reagents provided by the manufacturer : anti-JAK1 (1:25 ; Rat, Biotechne MAB4260), anti-Phospho-JAK1 (1:100 ; Rabbit,

RESULTATS : EFFETS DE LA 3-OXO-C12 :2-HSL, MOLECULE NATURELLE, SUR L'HOMEOSTASIE INTESTINALE

Invitrogen 44422G), anti-JAK2 (1:13 ; Rabbit, Cell Signalling, 3230), anti-Phospho-JAK2 (1:13 ; Rabbit, Cell Signalling 3776), anti-STAT1 (1:50 ; Rabbit, Cell Signalling 9172), anti-Phospho-STAT1 (1:40 ; Rabbit, Biotechne AF2894), anti-Actin (1:1000 ; Rabbit, Millipore MAB1501R). Data were analysed using Compass for SW3.1 software (ProteinSimple). Protein levels were determined by chemiluminescence signal (AUC) and Phospho-Protein levels were normalized to the total protein of interest, after verification that actin levels do not differ between conditions ($p = 0.745$).

Bitter Taste Receptors Screening

Bitter taste receptor cDNA were cloned into pcDNA4 mammalian expression vector (Invitrogen) using full coding receptor sequences reported on UniProt database. The synthetic constructs were codon optimized (Genewiz) and combine the first 45 amino acids of rat somatostatin type 3 receptor at the amino terminus to improve plasma membrane targeting of the receptors in the heterologous expression system. The FLAG epitope was added at the carboxy terminus without interfering with the functionality of the receptors and can be used for immunocytochemistry. The calcium-mobilization assays were performed using human embryonic kidney cells (HEK293T) stably transfected with chimeric $G\alpha_{16}$ gust44 protein⁶⁵. Cells were seeded in 96-wells black clear plates coated with poly-D-lysine at a density of 35000 cells/100 μ L in high glucose DMEM supplemented with 10% dialysed fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Twenty-four hours later, the cells were transiently co-transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) with one of the TAS2R synthetic optimized vectors or empty expression plasmid, as a negative control, and the pCMV-GCaMP5G construct (Addgene #31788) coding for a genetically encoded calcium indicator^{66,67}. Twenty-four hours after transfection, cells were washed twice with C1 buffer (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2mM CaCl₂, 5mM sodium pyruvate, pH7.4). Test substances were solved in DMSO and further diluted in C1 buffer. Next, the cells were placed in a fluorometric imaging plate reader (Flexstation® 3, Molecular Devices) and stimulated with automatic injection of increasing concentrations of HSLs. Calcium responses leading to increase in fluorescence were monitored at 510 nm after excitation at 488 nm. Experiments were performed in duplicates and repeated at least four times. The recorded calcium levels of each wells receiving the same stimulus were averaged, response of mock-transfected cells were subtracted from receptor transfected cells and net signals were normalized to background fluorescence (F/F_0 , F_0 fluorescence light before stimulus application). The resulting dose-response curves of the averaged fluorescent signal amplitudes against the logarithm of the agonist concentration were fitted using Sigma Plot software. For data analysis, the four-parameter logistic equation

$[f(x)=\min+(\max-\min)/(1+(x/EC50)^nH)]$ was used to calculate the half-maximal effective concentrations (EC50 values).

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted from RAW264.7 cells using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Reverse Transcription (RT) was performed with 1 µg RNA using LunaScript® RT SuperMix Kit (NewEngland Biolabs). Semi-quantitative real-time PCR was performed with the Mx3000P Stratagene system using SYBR Green (Applied Biosystems) according to the manufacturer's procedures. Cyclophilin was used as the reference gene. After amplification, Ct were determined. Sequences of the oligonucleotide primers used are reported in table 1.

Target gene (Protein)	Forward primer	Reverse primer
Tnf (TNFα)	CCAGACCCTCACACTGAGATC	CACTTGGTGGTTTGCTACGAC
Il1b (IL-1β)	AGTTGACGGACCCCAAAG	AGCTGGATGCTCTCATCAGG
Il10 (IL-10)	CTGGACAACATACTGCTAACC	GGGCATCACTTCTACCAGGTA
Ppib (Cyclophilin B)	GCCTTAGCTACAGGAGAGAA	TTTCCTCCTGTGCCATCTC

Table 1: Sequence of the primer used in this study

Intracellular calcium assay

RAW264.7 cells were seeded in 96-black-plate, clear bottom (Costar) at 20,000 cells per well. The next day, release of intracellular Ca²⁺ was measured using Fluo-4 (Fluo-4 Direct Calcium Assay; Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Medium was discarded and 100 µL of 1 X Fluo-4 dye was incubated at 37 °C for 1h in 5 % CO₂, protected from light. Then, basal fluorescence was measured using an fluorospectrometer (FLUOstar Omega; BMG Labtech), excitation at 485 nm and emission at 520 nm. Molecules of interest were then added with an electronic pipette; thapsigargin (10 µM, Sigma) as a positive control, 3-oxo-C12:2-HSL (1,000 µM) or DMSO 0.5 %; with 8 replicates per conditions for every experiments. The fluorescence signal was immediately measured every 80 sec for 2 h. Results are expressed as a ratio of the fluorescence at time x over the basal fluorescence (F/F₀).

Quantification and statistical analysis

Data are expressed as means ± standard error of the mean (SEM) unless otherwise indicated. The number of independent experiments and replicates are indicated in the figure legends. Figures and statistical analyses were performed with Graphpad® Prism 8.0 (Ritme

Informatique, Paris, France). Normal distribution was tested using Shapiro-Wilk test. When normal distribution was confirmed, statistical differences between the means were assessed by ANOVA or t-test otherwise by a non-parametric Kruskal-Wallis test. Post-test are indicated in the legend of the figures. For all results, $p < 0.05$ was considered statistically significant. Values are represented as follows: * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $p < 0.0001$ Statistical details of experiments and exact value of n can be found in the figure legends.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics declarations: Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were extracted from whole blood of anonymous donor and collected by *Etablissement Français du Sang* of Paris, France. Informed consent was obtained from all participants.

Acknowledgments: This research was funded by Fondation pour la Recherche Médicale, grant number EQU202003010171 and by Association François Aupetit (projects research on AHLs 2019 and 2021). G. Coquant was the recipient of a fellowship from Fondation pour la Recherche Médical FRM ECO201806006843. D. Aguanno was the recipient of a fellowship from CORDDIM, Ile-de-France region. The authors acknowledge the Association François Aupetit for its unwavering support. The authors thank Marielle Moreau for the WES analysis and the *Institut du Cerveau et de la Moelle épinière* for the RNA sequencing.

Author contributions

GC, ST, PS conceived the experiments; GC, DA, L. Brot, CB, JD and NR conducted the experiments and analysis; LDS, J-PG, VC, ST, PS, L. Briand supervised the work, GC and PS wrote the main manuscript text; GC prepared all the figures. Funding Acquisition: ST, PS. All authors reviewed the manuscript.

References:

1. Maaser, C. *et al.* ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *Journal of Crohn's and Colitis* **13**, 144-164K (2019).
2. Burisch, J., Jess, T., Martinato, M. & Lakatos, P. L. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *Journal of Crohn's and Colitis* **7**, 322–337 (2013).
3. Hernandez-Rocha, C. & Vande Casteele, N. Corrigendum to 'JAK inhibitors: Current position in treatment strategies for use in inflammatory bowel disease'. *Current Opinion in Pharmacology* **58**, 68 (2021).
4. Hashash, J. Biologic monotherapy versus combination therapy with immunomodulators in the induction and maintenance of remission of Crohn's disease and ulcerative colitis. *aog* (2021) doi:10.20524/aog.2021.0645.
5. Sokol, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 16731–16736 (2008).
6. IBDMDB Investigators *et al.* Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature* **569**, 655–662 (2019).
7. Sokol, H. & Seksik, P. The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host: *Current Opinion in Gastroenterology* **26**, 327–331 (2010).
8. Cheng, Y.-W. & Fischer, M. Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis. Are We Ready for Primetime? *Gastroenterology Clinics of North America* **49**, 739–752 (2020).
9. Saint-Antoine IBD Network *et al.* Fecal microbiota transplantation to maintain remission in Crohn's disease: a pilot randomized controlled study. *Microbiome* **8**, 12 (2020).
10. Lavelle, A. & Sokol, H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (2020) doi:10.1038/s41575-019-0258-z.
11. Duboc, H. *et al.* Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* **62**, 531–539 (2013).
12. Lamas, B. *et al.* CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* **22**, 598–605 (2016).
13. Quevrain, E. *et al.* Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* (2016).
14. Coquant, G., Grill, J.-P. & Seksik, P. Impact of N-Acyl-Homoserine Lactones, Quorum Sensing Molecules, on Gut Immunity. *Front. Immunol.* **11**, 1827 (2020).
15. Landman, C. *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* **13**, e0202587 (2018).
16. Aguanno, D. *et al.* The intestinal quorum sensing 3-oxo-C12:2 Acyl homoserine lactone limits cytokine-induced tight junction disruption. *Tissue Barriers* 1832877 (2020) doi:10.1080/21688370.2020.1832877.
17. Moreira Lopes, T. C., Mosser, D. M. & Gonçalves, R. Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. *Inflamm. Res.* **69**, 1163–1172 (2020).
18. Bryan, A. *et al.* Human transcriptome analysis reveals a potential role for active transport in the metabolism of Pseudomonas aeruginosa autoinducers. *Microbes and Infection* **12**, 1042–1050 (2010).
19. Lu, P., Zhang, C.-H., Lifshitz, L. M. & ZhuGe, R. Extraoral bitter taste receptors in health and disease. *Journal of General Physiology* **149**, 181–197 (2017).

20. Jeon, T.-I., Seo, Y.-K. & Osborne, T. F. Gut Bitter Taste Receptor Signaling Induces ABCB1 through a Mechanism Involving CCK. *Biochem J* **438**, 33–37 (2011).
21. Latorre, R. *et al.* Expression of the Bitter Taste Receptor, T2R38, in Enteroendocrine Cells of the Colonic Mucosa of Overweight/Obese vs. Lean Subjects. *PLoS ONE* **11**, e0147468 (2016).
22. Turner, A. *et al.* Interactions between taste receptors and the gastrointestinal microbiome in inflammatory bowel disease. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism* **18**, 100106 (2019).
23. Yu, Y. *et al.* Berberine induces GLP-1 secretion through activation of bitter taste receptor pathways. *Biochemical Pharmacology* **97**, 173–177 (2015).
24. Maurer, S. *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. *Frontiers in Immunology* **6**, (2015).
25. Tran, H. T. T., Herz, C., Ruf, P., Stetter, R. & Lamy, E. Human T2R38 Bitter Taste Receptor Expression in Resting and Activated Lymphocytes. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
26. Verbeurgt, C. *et al.* The human bitter taste receptor T2R38 is broadly tuned for bacterial compounds. *PLOS ONE* **12**, e0181302 (2017).
27. Greene, T. A. *et al.* Probenecid Inhibits the Human Bitter Taste Receptor TAS2R16 and Suppresses Bitter Perception of Salicin. *PLoS ONE* **6**, e20123 (2011).
28. Wölfle, U. *et al.* Expression and Functional Activity of the Human Bitter Taste Receptor TAS2R38 in Human Placental Tissues and JEG-3 Cells. *Molecules* **21**, 306 (2016).
29. Meyerhof, W. *et al.* The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors. *Chemical Senses* **35**, 157–170 (2010).
30. Telford, G. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* **66**, 36–42 (1998).
31. Glucksam-Galnoy, Y. *et al.* The Bacterial Quorum-Sensing Signal Molecule N-3-Oxo-Dodecanoyl-L-Homoserine Lactone Reciprocally Modulates Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Activated Macrophages. *The Journal of Immunology* **191**, 337–344 (2013).
32. Kravchenko, V. V. *et al.* Modulation of Gene Expression via Disruption of NF-κB Signaling by a Bacterial Small Molecule. *Science* **321**, 259 (2008).
33. Li, Y. *et al.* N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone promotes the induction of regulatory T-cells by preventing human dendritic cell maturation. *Exp Biol Med (Maywood)* **240**, 896–903 (2015).
34. Ritchie, A. J. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infection and immunity* **73**, 1648–55 (2005).
35. Hooi, D. S. W., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Williams, P. & Pritchard, D. I. Differential Immune Modulatory Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Molecules. *Infection and Immunity* **72**, 6463–6470 (2004).
36. Peyrottes, A. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Analogues of N-Acyl Homoserine Lactones on Eukaryotic Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (2020).
37. Isidro, R. A. & Appleyard, C. B. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. **15**.
38. Darnell, J., Kerr, I. & Stark, G. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415–1421 (1994).

39. Held, T. K., Weihua, X., Yuan, L., Kalvakolanu, D. V. & Cross, A. S. Gamma Interferon Augments Macrophage Activation by Lipopolysaccharide by Two Distinct Mechanisms, at the Signal Transduction Level and via an Autocrine Mechanism Involving Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1. *Infect Immun* **67**, 206–212 (1999).
40. Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B. & Ley, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.* **10**, 1084 (2019).
41. Danese, S., Argollo, M., Le Berre, C. & Peyrin-Biroulet, L. JAK selectivity for inflammatory bowel disease treatment: does it clinically matter? *Gut* **68**, 1893–1899 (2019).
42. Karlsson, T., Turkina, M. V., Yakymenko, O., Magnusson, K.-E. & Vikström, E. The *Pseudomonas aeruginosa* N-Acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Molecules Target IQGAP1 and Modulate Epithelial Cell Migration. *PLoS Pathogens* **8**, e1002953 (2012).
43. Moura-Alves, P. *et al.* Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Science (New York, N.Y.)* **366**, (2019).
44. Cooley, M. A., Whittall, C. & Rolph, M. S. *Pseudomonas* signal molecule 3-oxo-C12-homoserine lactone interferes with binding of rosiglitazone to human PPAR γ . *Microbes and Infection* **12**, 231–237 (2010).
45. Jahoor, A. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Mediate Host Cell Proinflammatory Responses to *Pseudomonas aeruginosa* Autoinducer. *Journal of Bacteriology* **190**, 4408–4415 (2008).
46. Lee, R. J. *et al.* T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J. Clin. Invest.* **122**, 4145–4159 (2012).
47. Gaida, M. M. *et al.* Expression of the bitter receptor T2R38 in pancreatic cancer: localization in lipid droplets and activation by a bacteria-derived quorum-sensing molecule. *Oncotarget* **7**, (2016).
48. Jaggupilli, A., Singh, N., Jesus, V. C. D., Duan, K. & Chelikani, P. Characterization of the Binding Sites for Bacterial Acyl Homoserine Lactones (AHLs) on Human Bitter Taste Receptors (T2Rs). *ACS Infect. Dis.* **4**, 1146–1156 (2018).
49. Dagan-Wiener, A. *et al.* BitterDB: taste ligands and receptors database in 2019. *Nucleic Acids Research* **47**, D1179–D1185 (2019).
50. Andrews, S. *fastQC*. (Babraham Institute, 2019).
51. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* **17**, 10 (2011).
52. Krueger, F. *Trim Galore*. (Babraham Institute, 2019).
53. Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A. & Kingsford, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* **14**, 417–419 (2017).
54. Team, R. D. C. *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. (2020).
55. Sonesson, C., Love, M. I. & Robinson, M. D. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* **4**, 1521 (2015).
56. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**, (2014).
57. Dray, S. & Dufour, A. B. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**, (2007).
58. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**, 289–300 (1995).
59. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. (Springer-Verlag New York, 2016).
60. Fresno, C. & Fernandez, E. A. RDAVIDWebService: a versatile R interface to DAVID. *Bioinformatics* **29**, 2810–2811 (2013).

61. Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**, 25–29 (2000).
62. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
63. Alhamdoosh, M. *et al.* Combining multiple tools outperforms individual methods in gene set enrichment analyses. *Bioinformatics* btw623 (2016)
doi:10.1093/bioinformatics/btw623.
64. Kolde, R. *pheatmap: Pretty Heatmaps.* (2019).
65. Raliou, M. *et al.* Human Genetic Polymorphisms in T1R1 and T1R3 Taste Receptor Subunits Affect Their Function. *Chemical Senses* **36**, 527–537 (2011).
66. Akerboom, J. *et al.* Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci* **32**, 13819–13840 (2012).
67. Cai, B. *et al.* A Cell-Based Functional Assay Using a Green Fluorescent Protein-Based Calcium Indicator dCys-GCaMP. *ASSAY and Drug Development Technologies* **12**, 342–351 (2014).

Figure legends

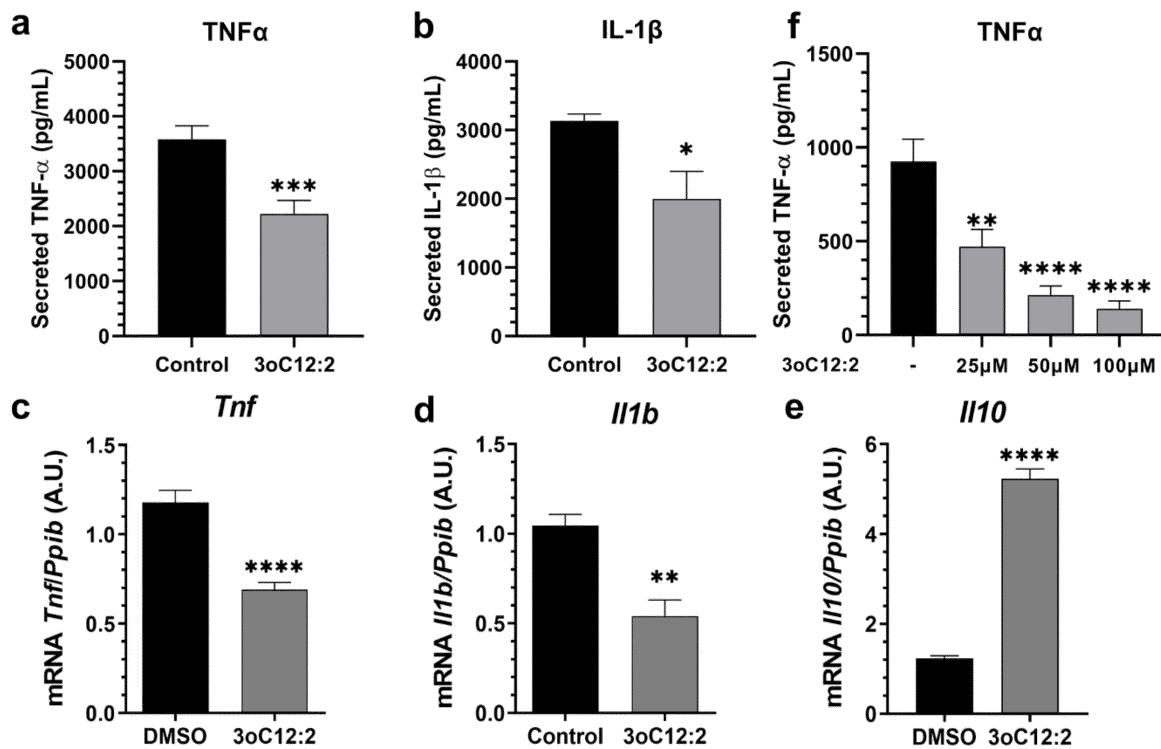


Figure 1: 3-oxo-C12:2-HSL decreases pro-inflammatory cytokine secretion by immune cells. (a), (b): secreted TNF α , IL-1 β levels measured by ELISA from supernatant after RAW264.7 macrophages were exposed to 50 μ M of 3-oxo-C12:2-HSL with LPS and IFN γ for 6 hours. Unpaired t-test, * P \leq 0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001 vs. control. (c), (e), (f): mRNA levels for *Tnf*, *Il1b*, *Il10* genes measured by RT-qPCR after RAW264.7 macrophages were exposed to 50 μ M of 3-oxo-C12:2-HSL with LPS and IFN γ for 2 hours.. Results are expressed in arbitrary unites as a ratio of the target gene to cyclophilin (*Ppib*) as the housekeeping gene. Unpaired t-test, * P \leq 0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001 vs. control. (f): Secreted TNF α measured by ELISA from supernatant of PBMC exposed to a range of concentration of 3-oxo-C12:2-HSL with LPS (10 ng/mL). One Way ANOVA Dunnett's post-test. 3oC12:2 stands for 3-oxo-C12:2-HSL. (mean \pm SEM of triplicates from 3 independent experiments)

RESULTATS : EFFETS DE LA 3-OXO-C12 :2-HSL, MOLECULE NATURELLE, SUR L'HOMEOSTASIE INTESTINALE

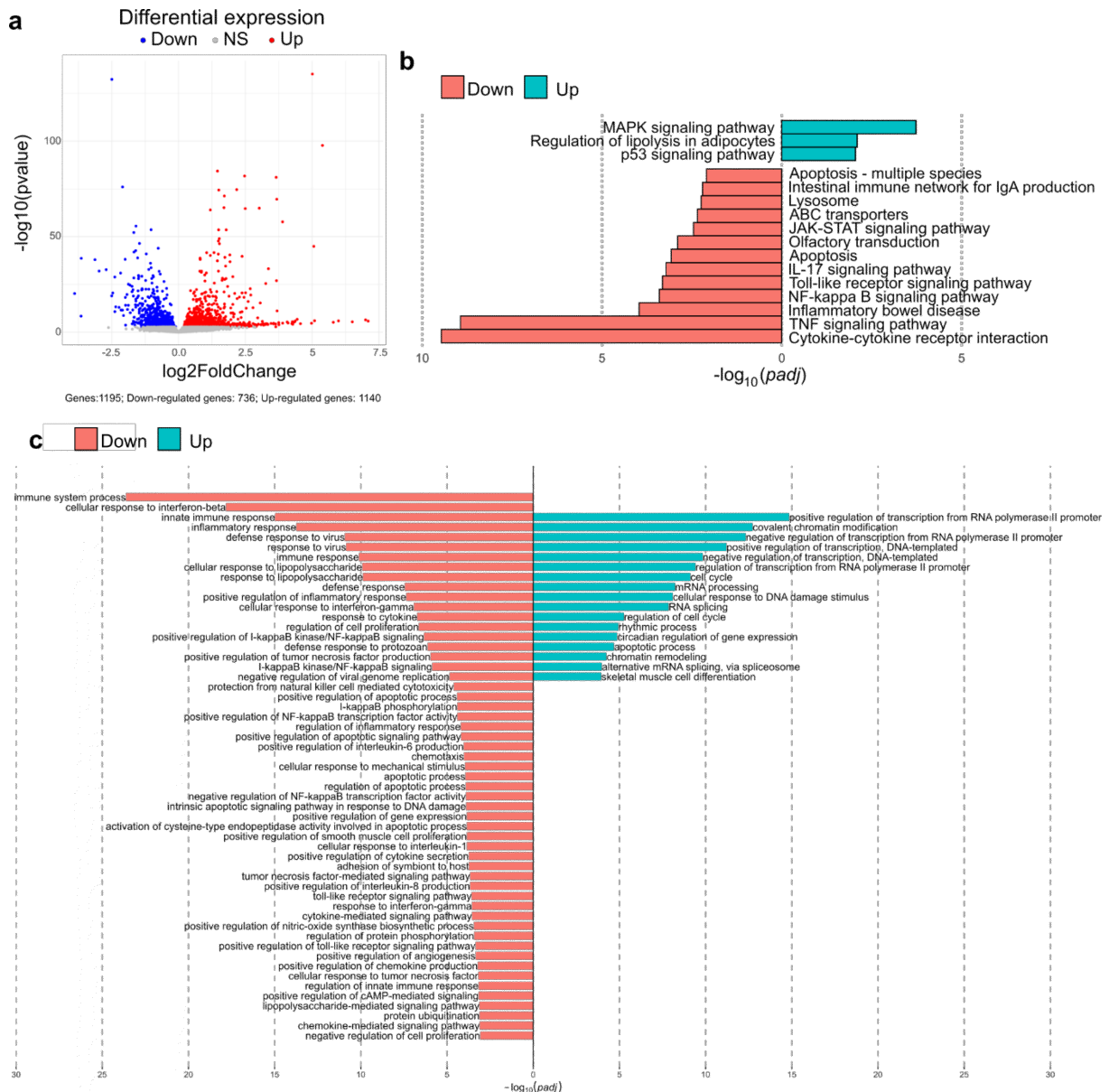


Figure 2: 3-oxo-C12:2-HSL modulates gene expression in RAW264.7 macrophage cells
(a): Volcano plot of differentially expressed genes between the control and 3-oxo-C12:2-HSL-exposed cells. The blue, grey and red dots represent down regulated, not significantly regulated and up regulated genes respectively. **(b)** Significant Gene Ontology (GO) biology processes enriched by differentiated expressed genes modulated by 3-oxo-C12:2-HSL. Terms annotation were made with Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID). The red and green bars represent down-regulated and up regulated pathways respectively. **(c):** Significant KEGG pathways differentially modulated by 3-oxo-C12:2-HSL and identified by EGSEA method (p value <0.01). The red and green bars represent down-regulated and up regulated pathways respectively. The figures **(c)** shows a selection of pathways involved in inflammation processes; to see all the pathways, see Supplementary Figure 2 (GO: Gene Ontology, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

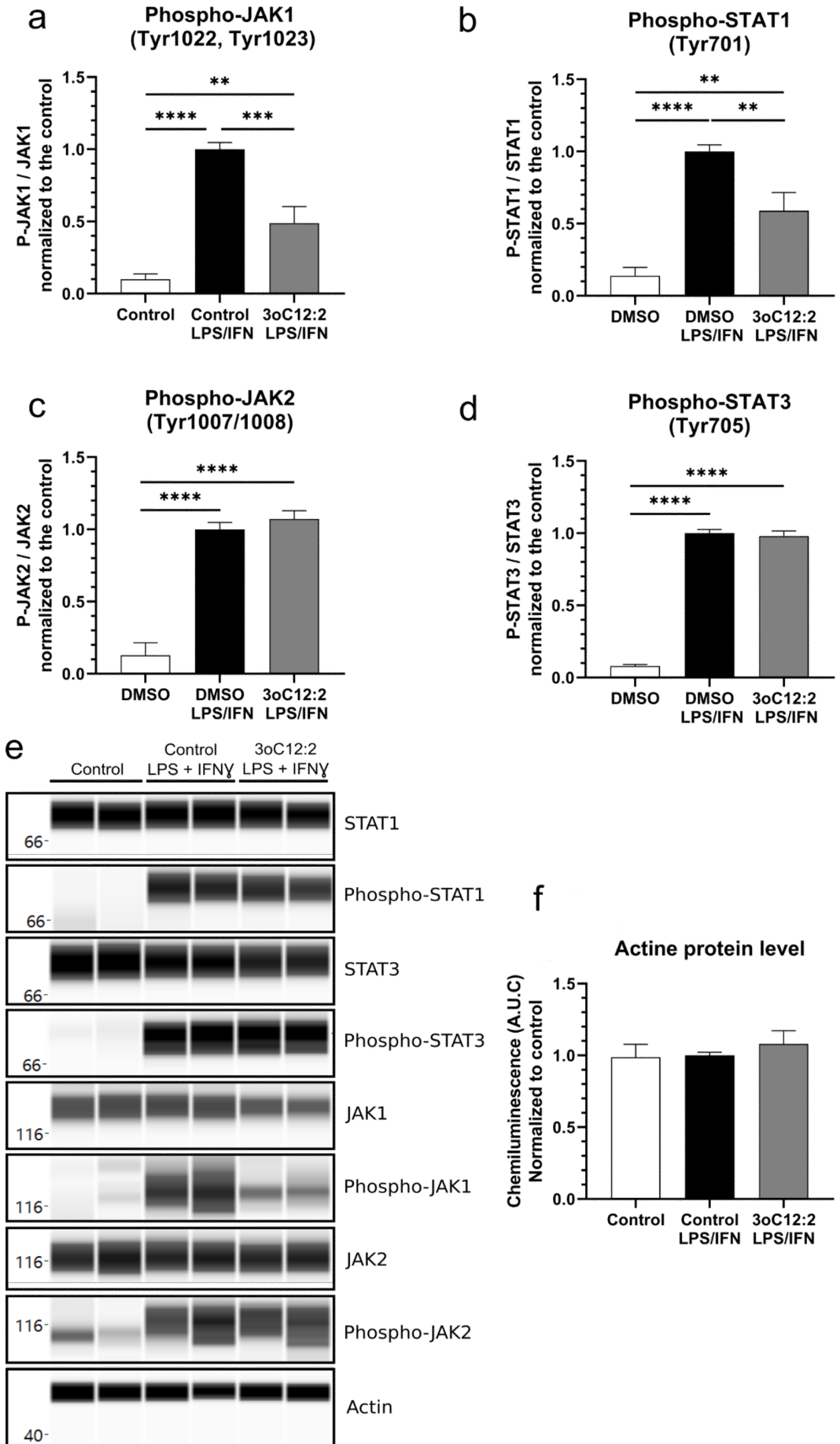


Figure 3: 3-oxo-C12:2-HSL prevents the activation of the JAK-STAT pathway

(a) Protein levels of P-JAK1 normalized to the total JAK1 protein (b) Protein levels of P-STAT 1 normalized to the total STAT1 protein (c) Protein levels of P-JAK2 normalized to the total JAK2 protein (d) Protein levels of P-STAT3 normalized to the total STAT3 protein. (f) Protein level of Actin. Protein levels were quantified by Wes™ capillary electrophoresis. (e) Reconstructed images are displayed, based on the area under the curve from chemiluminescence signal obtained for one experiment, representative of 3 independent experiments. Molecular markers are indicated on the left (kDa) Phospho-protein levels are expressed as a ratio of the Phosphorylated protein to the total protein from the area under the curve from chemiluminescence results. One-Way ANOVA, Dunnett's post-test ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001 vs. control (mean ± SEM of triplicates from 3 independent experiments). 3oC12:2 stands for 3-oxo-C12:2-HSL.

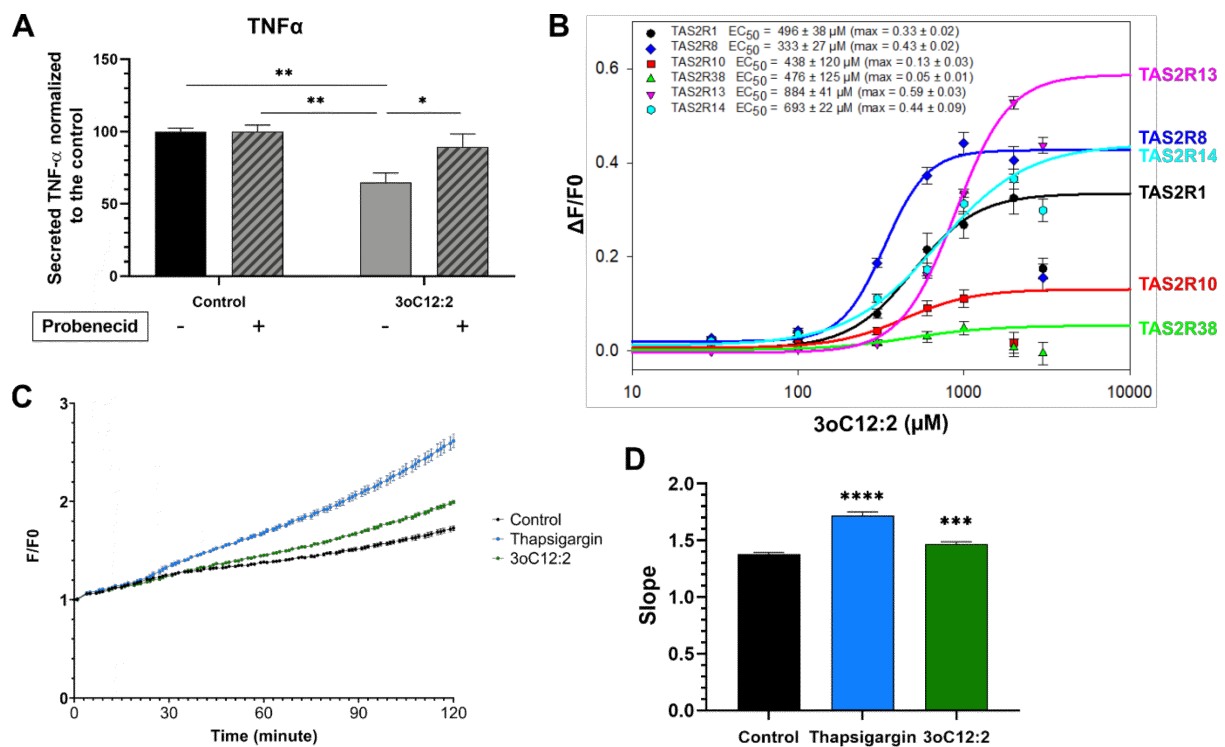


Figure 4: 3-oxo-C12:2-HSL interacts with bitter taste receptors. (a): RAW264.7 macrophages were pre-treated for an hour with Probenecid (1mM), an allosteric inhibitor of the bitter taste receptor T2R138. When exposed to 3-oxo-C12:2-HSL combine with Probenecid, the level of secreted TNF α is the same as the control, the anti-inflammatory effect of the AHL is lost. mean \pm SEM of triplicates from 3 independent experiments, Two Way ANOVA Tukey's post-test (b): Dose response of bitter taste expressing HEK293 cells after stimulation with 3-oxo-C12:2-HSL. (c): Intracellular calcium flux in RAW264.7 cells exposed to 3-oxo-C12:2-HSL (1,000 μM) or thapsigargin (10 μM) as a positive control or DMSO (0.5%) as a negative control. Fluorescence (F) was measured for two hours and normalized to the basal fluorescence (F0). figure representative of 3 independent experiment of 8 replicates. (d): Quantification of the area under the curve detailed in (c). * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs. control. 3oC12:2 stands for 3-oxo-C12:2-HSL

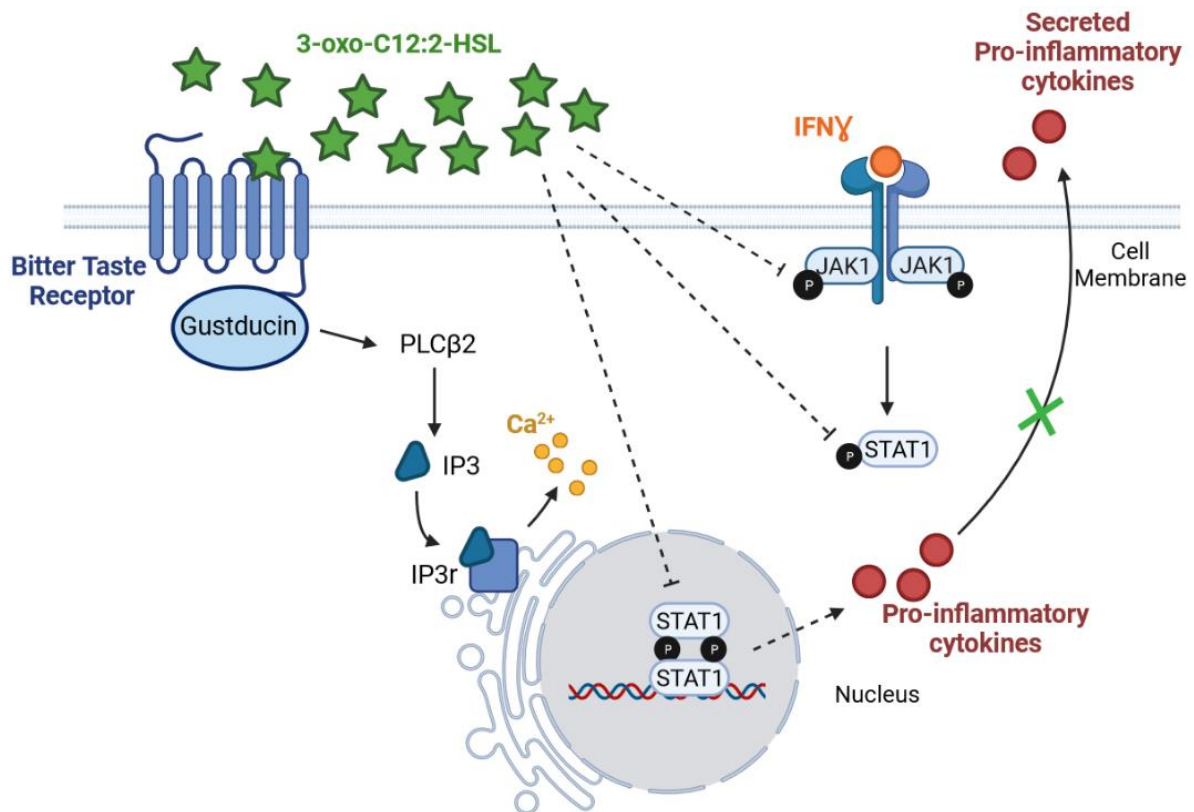
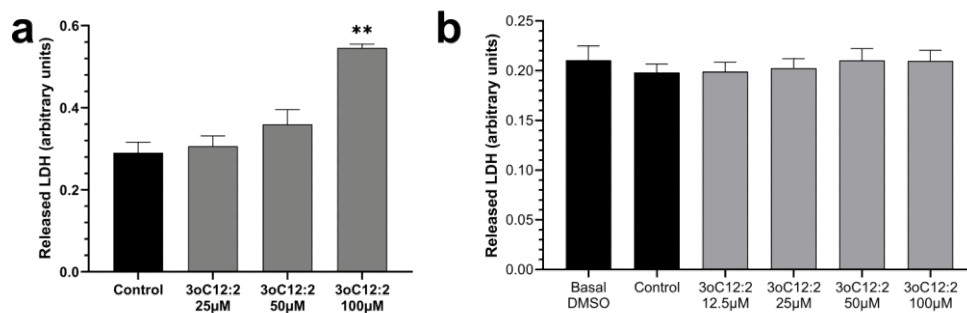


Figure 5: Proposed mechanisms of 3-oxo-C12:2-HSL effects on inflammation

In immune cells, 3-oxo-C12:2-HSL is able to activate bitter taste receptors, a G-protein coupled receptor, triggering a signalling cascade resulting in the release of calcium from the endoplasmic reticulum. In addition, in RAW264.7 cells activated by lipopolysaccharides and interferon- γ , 3-oxo-C12:2-HSL prevents from the activation of the JAK-STAT pathways, by specifically preventing JAK1 and STAT1 phosphorylation. This leads to a decrease in the pro-inflammatory cytokine secretion and an overall diminished inflammatory response. Furthermore, when bitter taste receptors are inhibited, the anti-inflammatory response is lost.

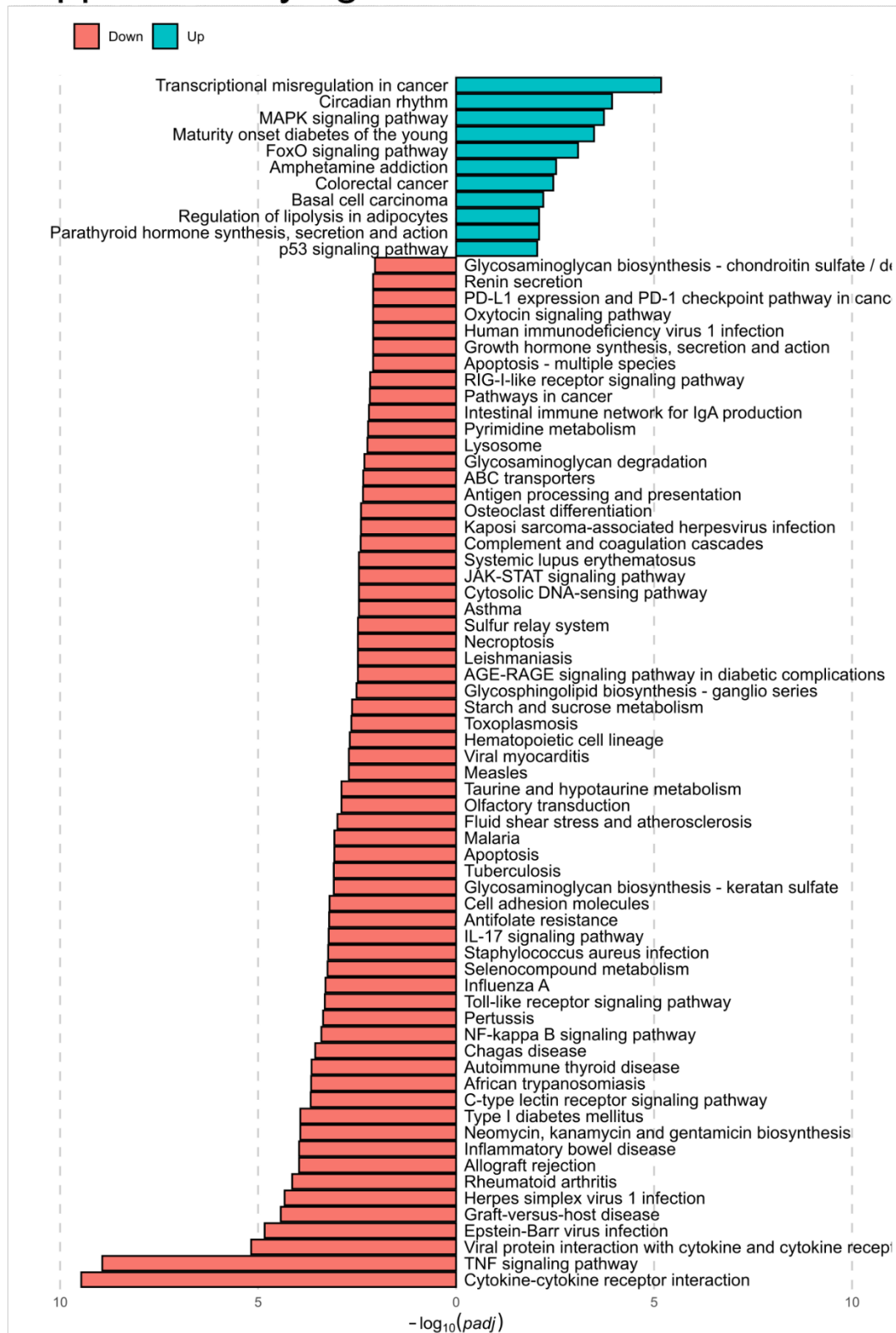
Supplemental information titles and legends

Supplementary figure 1



Supplementary figure 1: Cytotoxicity of 3-oxo-C12:2-HSL in RAW264.7 and PBMC. Cytotoxicity is expressed as arbitrary unites representing LDH released in the media. **a:** RAW264.7 cells, **b:** PBMC from healthy donors.

Supplementary figure 2



Supplementary figure 2: GO pathways differentially modulated by 3-oxo-C12:2-HSL. The red and green bars represent down-regulated and up regulated pathways respectively.

B. Effets des AHLs sur la fonction de barrière intestinale (Article 2)

J'ai pu également prendre part à l'étude de la fonction de barrière intestinale exposée aux AHLs, lors du projet de thèse de Doriane Aguanno. J'ai notamment contribué aux expériences de perméabilité. Les résultats ont été publiés dans *Tissue Barriers*, article pour lequel je suis deuxième auteure. Au cours de ce travail, les effets de la 3-oxo-C12:2-HSL ont été comparés à la 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa*, molécule dont les effets ont été extensivement rapportés dans la littérature scientifique. La structure de ces deux molécules est très proche et les effets de la 3-oxo-C12-HSL ont été extensivement décrits. Nous avons démontré que, dans un contexte pro-inflammatoire, la 3-oxo-C12:2-HSL n'augmente pas la perméabilité paracellulaire, contrairement à la 3-oxo-C12-HSL. La deuxième partie de la publication, à laquelle j'ai moins participé, présente les mécanismes par lesquels la 3-oxo-C12:2-HSL préserve les jonctions serrées. Les effets passent par une diminution de l'ubiquitination des protéines des jonctions serrées induite par les cytokines pro-inflammatoires, en présence de 3-oxo-C12:2-HSL.

The intestinal quorum sensing 3-oxo-C12:2 Acyl homoserine lactone limits cytokine-induced tight junction disruption

Doriane Aguanno^{a,b}, Garance Coquant^a, Barbara G. Postal^{a,c,d}, Céline Osinski^e, Margaux Wieckowski^{a,b}, Daniel Stockholm^{a,b}, Jean-Pierre Grill^a, Véronique Carrière^a, Philippe Seksik^{a,f}, and Sophie Thenet^{a,b}

^aCentre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, INSERM, Paris, France; ^bEPHE, PSL University, Paris, France; ^cUniversité de Paris, Centre De Recherche sur l'Inflammation, INSERM UMR 1149, Paris, France; ^dBiology and Genetics of Bacterial Cell Wall Unit, Pasteur Institute, Paris, France; ^eSorbonne Université, INSERM, Nutrition and obesities: systemic approaches, Paris, France; ^fDépartement De Gastroentérologie Et Nutrition, 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.

ARTICLE HISTORY

Received 2 June 2020
Revised 21 September 2020
Accepted 23 September 2020

KEYWORDS



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

CONTACT Sophie Thenet  sophie.thenet@ephe.psl.eu  Centre De Recherche Saint-Antoine UMR_S, 938, Ecole Pratique Des Hautes Etudes, Paris, 75006, FRANCE

 Supplemental data for this article can be accessed on the [publisher's website](#)

© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

macromolecules, is restricted by occludin at bicellular TJs⁶ 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 gastrointestinal 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.⁴ Increased recruitment of leukocytes (including neutrophils, lymphocytes or macrophages) in close proximity to the epithelial lining leads to local accumulation of proinflammatory mediators such as inflammatory cytokines further exacerbating the epithelial barrier failure.^{9,10} 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^{11,12} and was shown to predict disease relapse.^{11,13} Linked with these permeability modifications, alterations of several TJ proteins, including increase in expression of the pore-forming claudin-2^{14,15} and decrease in several barrier-forming claudins,¹⁴ as well as decreased levels of JAM-A,^{14,16} occludin^{14,17} and tricellulin^{12,15} 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 state^{12,17} or in healthy relatives,¹² highlighting intestinal barrier impairment as a possible early step in the pathogenesis of IBD^{9,18} 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 metabolites.¹⁹ 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 formation.²⁰ Bacterial QS molecules also exert several effects on eukaryotic cells of the host, in a process named interkingdom signaling.²¹

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 pathogens.²² 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 subjects.²³ Importantly, 3-oxo-C12:2 AHL levels were reduced in IBD patients, more particularly during flare, and its absence was correlated with dysbiosis,²³ 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 (Figure 1). 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 barriers.²⁴ 3-oxo-C12 AHL has been shown to disturb a variety of biological processes in host cells,²⁵ among which perturbation of epithelial junctions. In intestinal epithelial cell lines, 3-oxo-C12 AHL induced an increased paracellular permeability to ions and macromolecules.^{26,27} This was accompanied by perturbation of the localization and phosphorylation of the TJ proteins occludin, ZO-1,^{27,28} tricellulin,²⁸ JAM-A, ZO-3,²⁹ together with the adherens junction proteins E-cadherin and β -catenin.²⁷ 3-oxo-C12:2 AHL has never been studied in this setting.

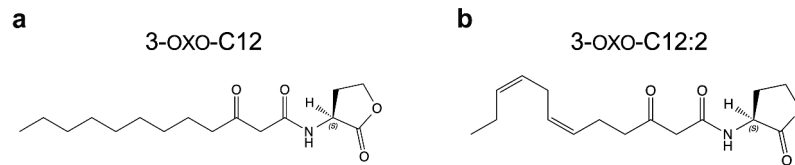


Figure 1. Chemical structure of 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 N-acyl-homoserine lactones. (a) N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (referred as 3-oxo-C12) is produced by *P. aeruginosa*. (b) Unsaturated 3-oxo-C12:2 homoserine lactone (referred as 3-oxo-C12:2) was identified in the human gut microbiota and was synthesized as described in.²³

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.^{30,31} Using Caco-2/TC7 cells as a model of polarized enterocytes, we evaluated the effects of both AHLs, alone 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 Caco-2/TC7 cell line, which is a clonal population established from human colon carcinoma Caco-2 cells at late passage.³² This cell line reproduces to a high degree most of the morphological and functional characteristics of normal human absorptive enterocytes.³² Caco-2/TC7 cells form mature intercellular junctions, which make them a good model of

intestinal epithelial barrier.^{33,34} The cells were used between passages 20 and 32 (starting from cloning) and were assessed for the absence of mycoplasma contamination. 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) (Eurobio Abcys, Courtaboeuf, France), 1% non-essential amino acids, penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) in a 10% CO₂/air atmosphere on semi-permeable filters (24 mm Transwell[®], 3 μ m pore size; Costar) for 16–18 days to reach optimal-differentiated state as described previously.³⁵ 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 (150 μ M, referred as 3-oxo-C12, Sigma Aldrich) or 3-oxo-C12:2 homoserine lactone (150 μ M, referred as 3-oxo-C12:2, synthesized as previously described²³) for 48 h, in the presence of the lactonase inhibitor 2-hydroxyquinoline (100 μ M, Sigma-Aldrich), in order to limit the hydrolysis of the AHL lactone ring.^{23,36} Similar concentrations of 3-oxo-C12, which are in the range of doses found in biofilms,³⁷ were previously shown to disrupt tight junctions in the parental cell line Caco-2.²⁶ Both AHLs were dissolved in DMSO and then diluted in the apical medium with a final concentration of DMSO as 0.075% for all conditions including untreated control cells. When indicated Interferon- γ (IFN γ) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) (50 ng/mL, R&D systems) were added in the basal compartment for 48 h. 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 (75 μ M) on the last 4 hours of the experiment.

In some experiments, Caco-2/TC7 enterocytes were co-cultured with activated THP-1 monocytic cells.³⁸ 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 μ g/ml) and 0.01% β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Prior to co-culture experiments, THP-1 cells were activated with LPS (10 ng/mL, Sigma-Aldrich) for 18 h. THP-1 cells were then harvested and centrifuged, and seeded (10^6 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 (150 μ M) or DMSO (total exposure time 48 h). Co-culture was maintained for 24 h prior to permeability measurements.

Permeability measurements in Caco-2/TC7 cells

To assess paracellular permeability, FITC-labeled dextran 4 kDa (1 mg/mL; TdB Consultancy AB, Uppsala, Sweden) or FITC-sulfonic acid 0.4 kDa (0.2 mg/mL; ThermoFisher Scientific) was added to the apical medium. Samples of basal medium were collected after 4 h, 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. Briefly, apical media were centrifuged 10 min at 250 g to remove intact extruded cells. 50 μ L of reaction mixture was added to 50 μ L of media supernatant per 96-well. After 10 min at room temperature, 25 μ L of stop solution was added. Absorbance at

490 nm was determined with a microplate spectrometer (FLUOstar Omega; BMG Labtech). Results are expressed as absorbance arbitrary units.

Immunofluorescence analysis of junctional proteins and image analysis

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 (rat monoclonal antibody 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, #33-9100; 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) and image analysis

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 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 calculated over 10 thresholded images per condition for each experiment and this representative value (λ) was then used to estimate the number of spots per image (estimated number of spots = integrated density of the field/ λ). In order to quantify scattering of tricellulin/ZO-1 PLA spots, images were first analyzed using QuPath software³⁹ for the detection of spots and transferred to ImageJ.⁴⁰ The ‘Tubeness’ plug-in (<https://www.longair.net/edinburgh/imagej/tubeness/>) was then applied to estimate the continuity of junctional networks. Data were presented as the tubeness average size. 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. All macros are available upon request.

All data were analyzed as the average from 4 to 5 random fields per biological duplicate or triplicate from three independent experiments.

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 μ g RNA using a high-capacity complementary DNA (cDNA) reverse transcriptase kit (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific). For claudin genes, as *CLDN4* (claudin 4) has no intron, RT was performed with 0.5 μ g of previously DNase-treated RNA

(Invitrogen™ Kit TURBO DNA-free). 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, Ct were determined and relative gene expression was analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Sequences of the oligonucleotide primers used are reported in Table 1.

Determination of protein levels by Wes™ capillary electrophoresis and ELISA

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 μ g/ μ L protein (for occludin, tricellulin and ZO-1 analysis), 0.2 μ g/ μ L protein (for E-cadherin analysis) or 0.5 μ g/ μ L protein (for p-MLC2 and MLC2 analysis), 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;

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used for real-time PCR in this study.

TARGET GENE (protein)	Forward	Reverse
<i>PPIB</i> (Cyclophilin B)	5' -GCCTTAGCTACAGGAGAGAA-3'	5' -TTTCCTCTGTGCCATCTC-3'
<i>TJP1</i> (ZO-1)	5' -CAGAGCCTTCTGATCATTCCA-3'	5' -CATCTCTACTCCGGAGACTGC-3'
<i>OCLN</i> (occludin)	5' -AGGAACCGAGAGCCAGGT-3'	5' -GGATGAGCAATGCCCTTTAG-3'
<i>MARVELD2</i> (tricellulin)	5' -CAGGCTGTCCTGAGGAAGTT-3'	5' -CCGAATGATGTGGCAATCT-3'
<i>CLDN2</i> (claudin-2)	5' -ATTGTGACAGCAGTTGGCTT-3'	5' -CTATAGATGTCACTGGGTGATG-3'
<i>CLDN4</i> (claudin-4)	5' -CTGTGGCCTCAGGACTCTCT-3'	5' -CAGAGGGGATCAGTCTCCAG-3'
<i>CLDN7</i> (claudin-7)	5' -AAAATGTACGACTGCGTGCTC-3'	5' -CACTTCATGCCCATCGTG-3'

BD Biosciences, Rungis, France, 1:1000). For Myosin Light Chain detection, the following antibodies were used: mouse monoclonal anti-MLC2 (clone 7C9, Novus, #NBP1-28871, 1:50), rabbit anti-pMLC2 (Ser19) (Cell signaling, #3671, 1:50). 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 ($p = .84$).

Myosin Light Chain Kinase (MLCK) concentrations were determined in total cell lysates by ELISA according to the manufacturer's instructions (CUSABIO # CSB-E09048h).

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. Statistical differences between the means of the groups were determined by either ordinary one-way ANOVA, or non-parametric Kruskal–Wallis test (when data did not pass test for normal distribution). When ordinary one-way ANOVA or Kruskal–Wallis test established statistical differences, comparisons between the following groups were performed respectively by Holm–Sidak's or Dunn's multiple-comparison post hoc tests: Control vs. all other conditions; 3-oxo-C12 vs. 3-oxo-C12:2; IFN γ +TNF α vs. IFN γ +TNF α + 3-oxo-C12; IFN γ +TNF α vs. IFN γ +TNF α + 3-oxo-C12:2; IFN γ +TNF α + 3-oxo-C12 vs. IFN γ +TNF α + 3-oxo-C12:2. $p < .05$ 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-C12:2 AHL compared to 3-oxo-C12 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,^{26,27} 3-oxo-C12 AHL induced a 4.8-fold increase in the macromolecular FITC-Dextran 4kDa (FD4) flux (Figure 2a) and a trend toward a 10% decrease in TEER (Figure 2b) compared to untreated control cells. 3-oxo-C12:2 AHL modified neither FD4 flux (Figure 2a) nor TEER (Figure 2b). These observations support our hypothesis of a beneficial role on the epithelial barrier. We then investigated whether these AHLs 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), previously shown to impair the intestinal barrier function by disrupting tight junctions.³⁰ IFN γ +TNF α induced a 5-fold increase in FD4 passage (Figure 2a) but had no significant effect on TEER (-5%, Figure 2b) compared to control. Strikingly, 3-oxo-C12 AHL significantly potentiated the cytokine effects on both FD4 flux (18-fold increase, Figure 2a) and TEER (30% decrease, Figure 2b). On the contrary, 3-oxo-C12:2 AHL did not modulate the cytokine-induced increase in paracellular permeability to macromolecules (Figure 2a) or to ions (Figure 2b). Similar response profiles were observed for 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 2c). 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, Figure 2c). While the addition of 3-oxo-C12 AHL

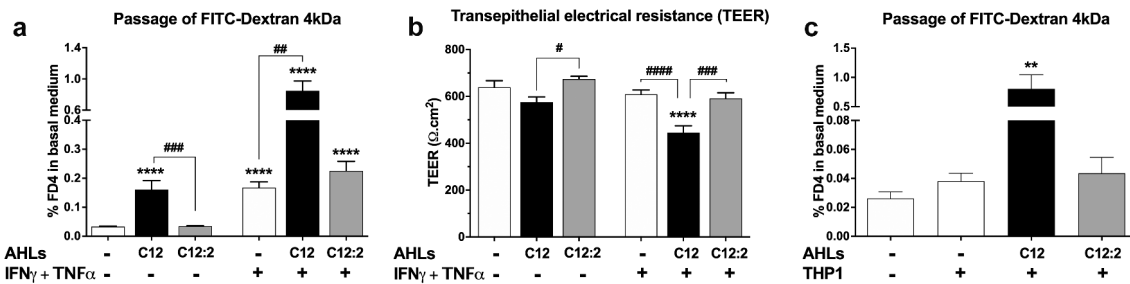


Figure 2. Distinct effects of 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 AHLs on paracellular permeability in Caco-2/TC7 cells in basal or inflammatory conditions. (a) Paracellular permeability to macromolecules assessed by the passage from the apical to the basal side of FITC-Dextran 4kDa (FD4) upon apical exposure to each AHL (150 μ M, 48 h) or basal exposure to IFN γ +TNF α (50 ng/mL, 48 h). Treatments were performed individually or in combination as indicated. Results are expressed as percentage of the initial quantity of tracer (mean \pm SEM of triplicates from 9 independent experiments, Kruskal-Wallis test ****P < .0001). (b) Paracellular permeability to ions assessed by the transepithelial electrical resistance (TEER). Treatments were as in (a) (mean \pm SEM of triplicates from 3 independent experiments, ordinary one-way ANOVA ****P < .0001). (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, 48 h) and co-cultured with activated monocytic THP-1 cells added in the basal compartment for the last 24 h of the experiment (mean \pm SEM of triplicates from 2 independent experiments, Kruskal-Wallis test **P < .01). For a, b and c, respective Holm-Sidak's or Dunn's posttests: **P < .01, ****P < .0001 vs. control; #P < .05, ##P < .01, ###P < .001, ####P < .0001 vs. indicated conditions. C12 stands for 3-oxo-C12 and C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

triggered a 30-fold rise in FD4 flux in the co-culture, 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 pathway.⁴¹ 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. In combination with 3-oxo-C12, the increase in LDH release was slightly greater (3-fold), but without statistical difference. Interestingly, in Caco-2/TC7 cells co-cultured with THP-1 monocytes, 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 IFN γ +TNF α , 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 IFN γ and TNF α 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 3a), and quantification of the fluorescence (Figure 3(b,c)), showed that treatment with 3-oxo-C12 AHL alone tended to reduce the signal of both transmembrane proteins occludin (Figure 3(a,b)), -19% vs control) and tricellulin (Figure 3(a,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 3(a,b,

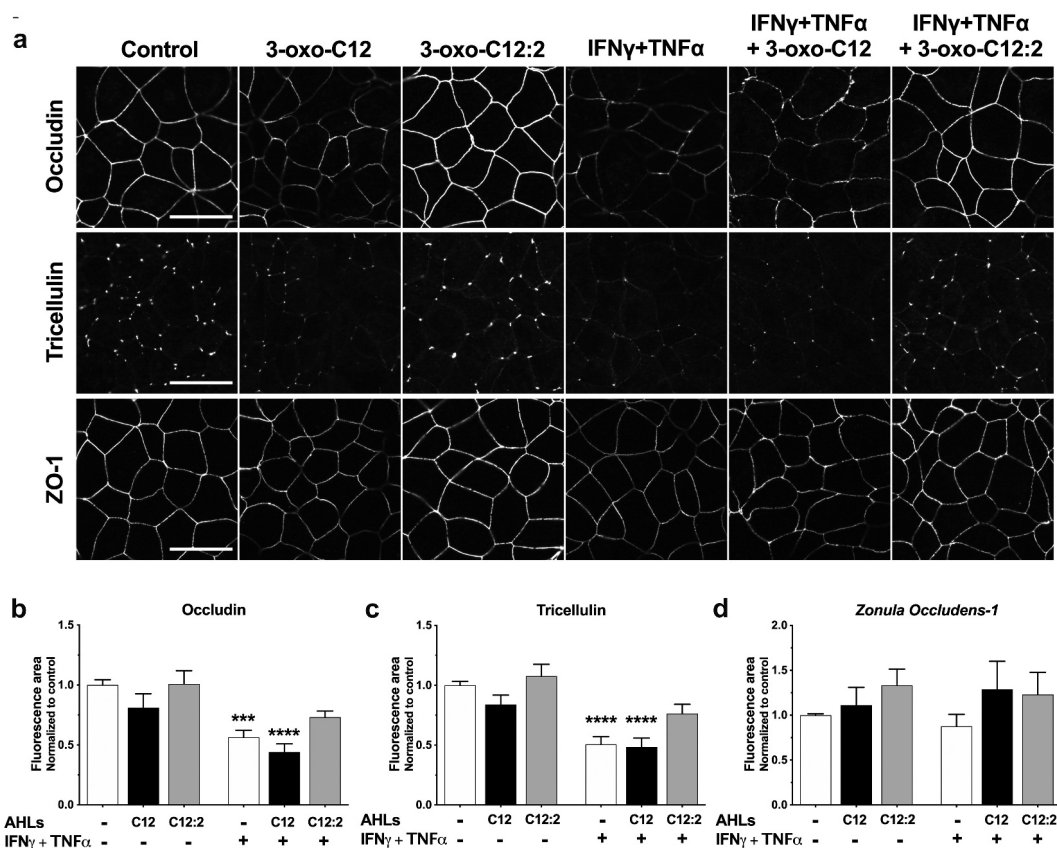


Figure 3. Opposite effects of 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 AHLs on tight junction proteins. (a) Representative fields of structured illumination microscopy images from immunofluorescence of occludin (bicellular contacts), tricellulin (tricellular junctions) and Zonula Occludens-1 (ZO-1) upon apical exposure of Caco-2/TC7 cells to each AHL (150 μ M, 48 h) and/or basal exposure to IFN γ +TNF α (50 ng/mL, 48 h). 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, ordinary one-way ANOVA ****P < .0001), tricellulin (c, mean \pm SEM of duplicates from 4 independent experiments, ordinary one-way ANOVA ****P < .0001) and Zonula Occludens-1 (ZO-1) (d, mean \pm SEM of duplicates from 3 independent experiments, Kruskal-Wallis test P = .3). Forband c, Holm-Sidak's post tests: *** P < .001 and **** P < .0001 vs. control. C12 stands for 3-oxo-C12; C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

c)), confirming an absence of deleterious effect on the barrier function.

Upon exposure to IFN γ +TNF α , signals at cell-contacts were significantly decreased compared to control for occludin (Figure 3(a,b), -44%) and tricellulin (Figure 3(a,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 3(a,b)), -27% vs. -44% with cytokines only) as well as for tricellulin (Figure 3(a,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 3a), and modifications between conditions did not reach statistical differences (Figure 3d). 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 IFN γ +TNF α , individually or in combination (Supplementary Figure 2). Conversely, 3-oxo-C12:2 AHL preserved E-Cadherin at cell-cell contacts and abolished cytokine-induced mislocalization (Supplementary Figure 2). Thanks to E-cadherin staining, which delineates cell contours,

irregular epithelial morphology was observed in the presence of cytokines as expected, whereas the regular cobblestone shape of Caco-2/TC7 was maintained with 3-oxo-C12:2.

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

To better understand at what level of TJ regulation the effects of AHLs occurred, 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 (*OCLN*, Figure 4a, *MARVELD2*, Figure 4b), as well as their total protein levels (Figure 4(d,f,g)). This tendency was maintained in combination with both AHLs without any distinct effects of each molecule compared to cytokines only (Figure 4(a,b,d,e,f,g)). It is worth noting that exposure to 3-oxo-C12:2 alone induced a slight increase in occludin mRNA levels (Figure 4a, 1.3-fold) and a similar tendency for tricellulin (Figure 4b, 1.3-fold), whereas 3-oxo-C12 AHL did not. In addition, ZO-1 gene mRNA levels (*TJPI1*, Figure 4c) and ZO-1 total protein levels (Figure 4(d,h)) remained unchanged in all conditions. Similarly, E-Cadherin levels were not modified (Figure 4(d,e)).

Although the pore pathway was less impacted than the leak pathway in our conditions, the expression of several claudins was analyzed. The level of the sealing claudin-7 mRNA was not significantly modified by pro-inflammatory cytokines, that of the sealing claudin-4 tended to be increased and the pore-forming claudin-2 was decreased (Supplementary Figure 3). As with occludin and tricellulin, the presence of either

AHL did not significantly modulate cytokine effects on mRNA levels of claudin genes.

Overall, pro-inflammatory cytokines IFN γ +TNF α tended to downregulate the expression of TJ proteins involved in the leak pathway, in accordance with the data from immunofluorescence analyses. 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 3), 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 5a, 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. When 3-oxo-C12:2 AHL was combined with cytokines, the pattern observed 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 (Figure 5b). A strong trend toward reduced counts of occludin/ZO-1 PLA spots was observed upon exposure to IFN γ +TNF α (−55% vs. control) or in co-treatment with 3-oxo-C12 (−46% vs. control). In accordance with the microscopy observations, quantification confirmed a significant preventing effect of 3-oxo-C12:2 AHL against the cytokine-induced drop of occludin/ZO-1 PLA spots.

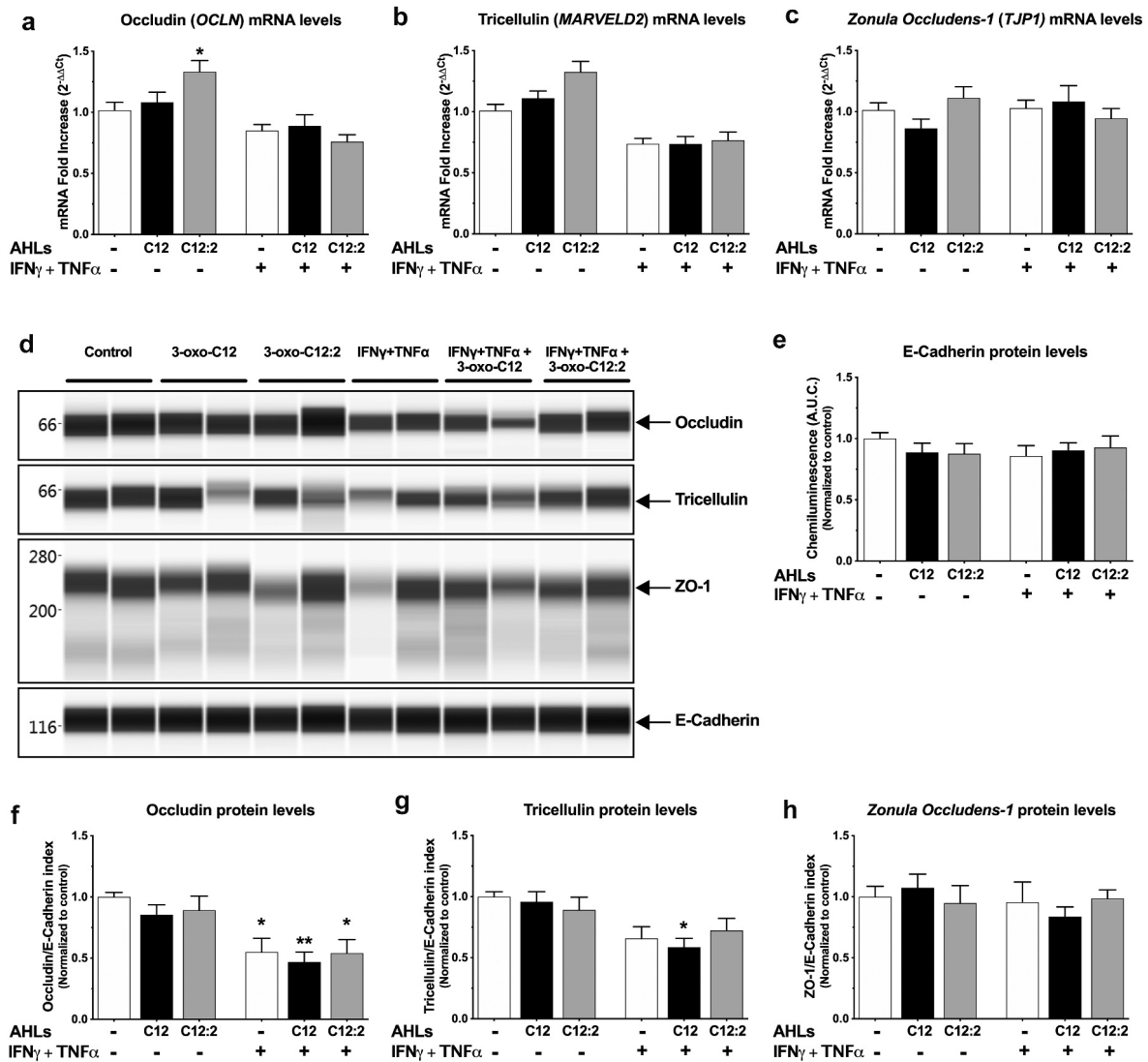


Figure 4. mRNA and total protein levels of occludin, tricellulin and ZO-1 upon exposure to each AHL in basal or inflammatory conditions. Caco-2/TC7 cells were treated on their apical side by each AHL (150 μ M, 48 h) or on their basal side by IFN γ +TNF α (50 ng/mL, 48 h). Treatments were performed individually or in combination as indicated. (**a, b, c**) mRNA levels were determined by (RT)-qPCR for occludin gene (*OCLN*) (**a**, ordinary one-way ANOVA **** P < .0001), tricellulin gene (*MARVELD2*) (**b**, Kruskal-Wallis test **** P < .0001) and Zonula Occludens-1 gene (*TJP1*) (**c**, ordinary one-way ANOVA P = .36). Results are expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ using cyclophilin as the house keeping gene (mean \pm SEM of triplicates from 3 independent experiments). (**d**) Total protein levels of occludin, tricellulin and Zonula Occludens-1 and E-cadherin were quantified by WesTM capillary electrophoresis. Reconstructed images are displayed, based on the area under the curve from chemiluminescence signal obtained for one experiment (representative of 3 independent experiments). Molecular weight markers (in kDa) are indicated on the left. (**e**) Total E-cadherin protein levels (Areas under the curve from chemiluminescence results, ordinary one-way ANOVA P = .82). (**f, g, h**) Total protein levels of occludin (**f**, ordinary one-way ANOVA **** P < .001), tricellulin (**g**, ordinary one-way ANOVA ** P < .01), and ZO-1 (**h**, ordinary one-way ANOVA P = .8): areas under the curve from chemiluminescence results are normalized to respective E-Cadherin levels, which do not differ between conditions (**e**), and expressed as ratio values normalized to the control condition (mean \pm SEM of duplicates from 3 independent experiments). For **a-c** and **e-h**, respective Holm-Sidak's or Dunn's posttests * P < .05 and ** P < .01 vs. control. C12 stands for 3-oxo-C12; C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

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 5a, 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 5a). Interestingly, in

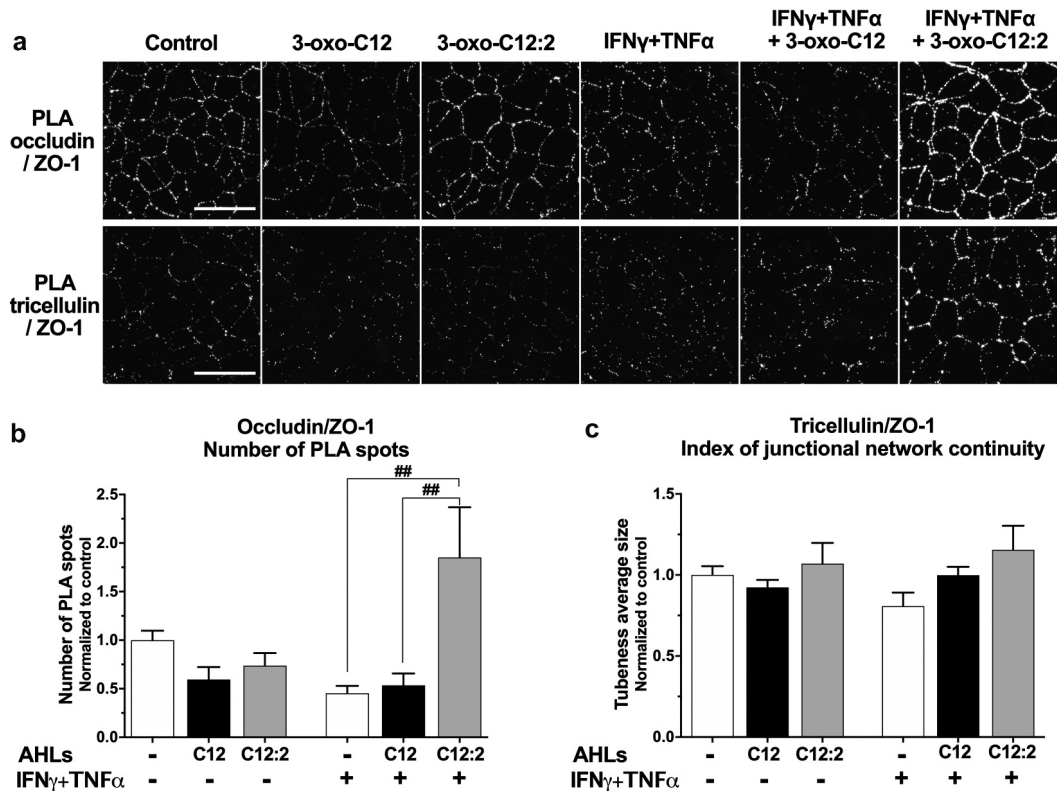


Figure 5. The 3-oxo-C12:2 AHL maintains interaction of occludin and tricellulin with their cytoplasmic partner Zonula Occludens-1 under inflammatory conditions. Caco-2/TC7 cells were treated as in Figures 2 and 3 and interactions between TJ proteins were analyzed by Proximity Ligation Assay (PLA) (a) 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, ordinary one-way ANOVA $**P < .01$, Holm-Sidak's posttests: $##P < .01$ vs. indicated conditions). (c) Quantification of the *tubeness* average size of Tricellulin/ZO-1 PLA spots, as an index of junctional network continuity (mean \pm SEM of 2 or 3 replicates from 3 independent experiments, ordinary one-way ANOVA $P = .23$). C12 stands for 3-oxo-C12; C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

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 5a, 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 preserved from cytokine-triggered scattering. To objectify the dispersal of tricellulin/ZO-1 complexes, we analyzed the continuity of junctional networks formed by PLA spots (Figure 5c). Although no statistical difference arose, the analysis showed that IFN γ +TNF α tended to disperse tricellulin/ZO-1 complexes and that 3-oxo-C12:2 AHL prevented this disorganization.

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 and the proper localization of complexes at cell-cell contacts.

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 cytokine damages. 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)^{30,41,42} 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 proteins.^{43–45} We did not find any modulation of either MLCK total protein levels or phosphorylated MLC2/total MLC2 levels (Supplementary Figure 4), 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.^{46,47} Occludin and tricellulin both undergo ubiquitination, which mediates their degradation.^{48,49} 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 ubiquitinated proteins (Figure 6a). In control cells, occludin/ubiquitin or tricellulin/ubiquitin PLA spots were scarce and mostly visualized at cell-cell contacts, which were visualized by E-Cadherin staining (Figure 6a, solid line arrows). In addition, a few intracellular PLA spots (close to the plasma membrane) also appeared in both cases (Figure 6a, dashed line arrows). The qualitative and quantitative results showed that in the presence of 3-oxo-C12 alone, but not 3-oxo-C12:2, the number of PLA spots tended to be increased for occludin/ubiquitin (Figure 6b, 1.8-fold increase *vs.* control) and tricellulin/ubiquitin (Figure 6c, 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 6b) and to a 3.5-fold increase in the number of tricellulin/ubiquitin PLA spots (Figure 6c). In co-treatment with 3-oxo-C12, this increase was maintained to a similar extent for tricellulin/ubiquitin PLA spots (Figure 6c), and it was slightly higher for occludin/

ubiquitin spots (Figure 6b, 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 6b) and the increase in the number of tricellulin/ubiquitin PLA spots was significantly attenuated (Figure 6c).

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 ubiquitinated 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 5) than observed without the dynamin inhibitor (Figure 6a). 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 5). These observations suggested that under inflammatory conditions, 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,^{48,49} which is known to ubiquitinate several cell-surface proteins and to mediate their endocytosis.⁵⁰ 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

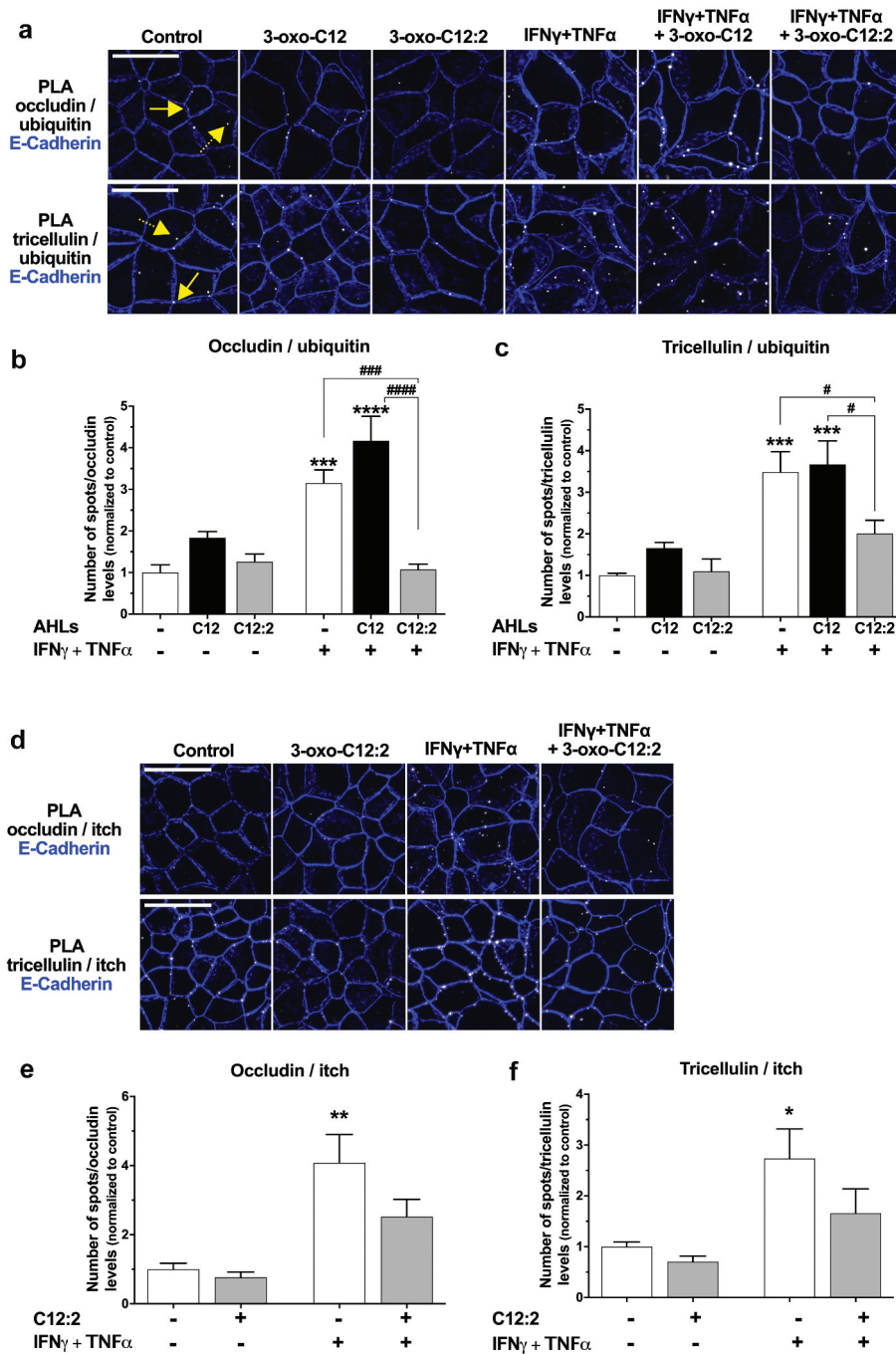


Figure 6. The 3-oxo-C12:2 AHL protects occludin and tricellulin from ubiquitination induced at the plasma membrane in presence of pro-inflammatory cytokines. Caco-2/TC7 cells were treated on their apical side by each AHL (150 μ M, 48 h) or on their basal side by IFN γ +TNF α (50 ng/mL, 48h). Treatments 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, ordinary one-way ANOVA ****P < .0001). (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, ordinary one-way ANOVA ****P < .0001). (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 PLA spots (e, mean \pm SEM of 2 or 3 replicates from 3 independent experiments, ordinary one-way ANOVA ***P < .001) or tricellulin/itch PLA spots (f, mean \pm SEM of 2 or 3

untreated cells showed scarce occludin/itch PLA spots, localized at the cell membrane (Figure 6d, upper panel). Interestingly, tricellulin/itch PLA spots were more abundant and were also strictly localized at cell-cell contacts (Figure 6d, lower panel). Microscopy analysis and PLA spots quantifications showed that treatment of cells with 3-oxo-C12:2 AHL alone did not significantly modify PLA spots pattern for occludin/itch (Figure 6(d,e)) or tricellulin/itch (Figure 6(d,f)), although we noticed a trend toward a decrease in their number (respectively -23% and -30% vs. control). Conversely, exposure to IFN γ +TNF α alone led to an increase in the number of PLA spots for occludin/itch (Figure 6(d,e), 4-fold increase vs. control) and tricellulin/itch interactions (Figure 6d,f), 2.7-fold increase vs. control). Concomitant treatment with 3-oxo-C12:2 AHL attenuated the increase in occludin/itch (Figure 6(d,e)) and tricellulin/itch PLA spots (Figure 6(d,f)) observed with cytokines.

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.

Altogether these results suggest that 3-oxo-C12:2 acts on itch-mediated ubiquitination of occludin and tricellulin at cell-cell contacts, before the engagement of these TJ proteins in the endocytic pathway.

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 a never described AHL,

3-oxo-C12:2, as the most prominent intestinal AHL.²³ 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*.

Several previous studies demonstrated that 3-oxo-C12 AHL, at doses in the range of concentrations found in biofilms,³⁷ disrupts epithelial barriers, in particular through alteration of tight junction proteins.^{26–29} On the opposite, our previous study showed no impact of 3-oxo-C12:2 on paracellular permeability to macromolecules in Caco-2/TC7 enterocytic cells.²³ While it is well known that different N-acyl-homoserine lactones with varying acyl chain length exhibit distinct properties,^{28,51,52} our group demonstrated the importance of acyl chain insaturations on biological activities.²³ 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 integrity,³⁰ or in co-culture with activated monocytic cells, 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 sulfonic acid 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 without improving epithelial permeability to either macromolecules or ions (Figure 7).

replicates from 3 independent experiments, ordinary one-way ANOVA **P < .01). Numbers of PLA spots are reported to occludin or tricellulin fluorescence levels and results are expressed as ratio values normalized to the control condition. For b, c, e and f, Holm-Sidak's post tests: *P < .05, **P < .01, ***P < .001, ****P < .0001 vs. control; #P < .05, ###P < .001, ####P < .0001 vs. indicated conditions. C12 stands for 3-oxo-C12; C12:2 stands for 3-oxo-C12:2.

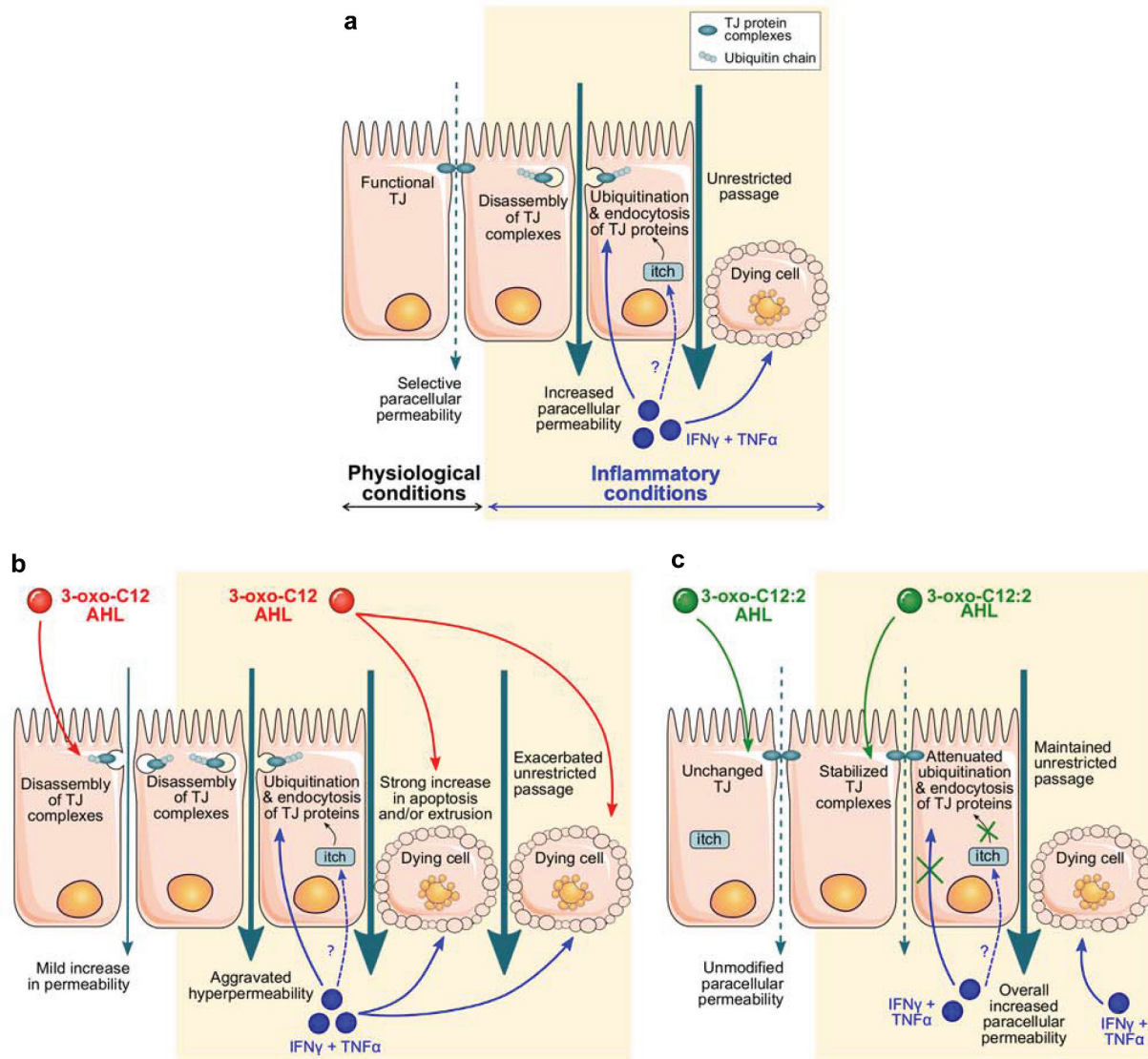


Figure 7. Proposed mechanisms explaining the distinct effects of 3-oxo-C12 and 3-oxo-C12:2 AHLs on the intestinal epithelial barrier under basal or inflammatory conditions. (a) In physiological conditions (left), tight junctions (TJ) seal the paracellular space between intestinal epithelial cells and control 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 increased paracellular permeability. How cytokines regulate itch interaction with TJ proteins remains to be determined (dashed arrow and question mark). In addition, cytokines induce a moderate rate of cell death, which participates in hyperpermeability through the TJ-independent unrestricted pathway. (b) Exposure to 3-oxo-C12 AHL alone (left) alters TJ integrity and induces 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.

In IBD, ulceration and epithelial apoptosis contribute to disruption of the intestinal barrier.^{14,53} 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 pathway.⁴¹ 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 macromolecule 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 7b), in accordance with studies showing that this AHL induces apoptosis in several cell types.^{52,54,55} 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 had beneficial effects of TJ-protecting 3-oxo-C12:2 AHL on epithelial permeability (Figure 7c).

We focused our study on two tight junction-associated MARVEL proteins (TAMPs) known to control the leak pathway: occludin and tricellulin and their cytoplasmic partner ZO-1. Although 3-oxo-C12 AHL did not quantitatively decrease signal of TJ proteins, their junctional localization was slightly altered by the molecule, in accordance with previous studies.^{26,28} Both occludin and tricellulin were diminished at cell-cell junctions in response to IFN γ and TNF α , as expected. On the contrary, the junctional localization of ZO-1 was much less affected and ZO-1 protein content remained unchanged unlike the two transmembrane proteins occludin and tricellulin, whose total levels were decreased upon cytokine treatment. These results may be explained by the fact that ZO-1 could be present at the plasma membrane through its interaction with many other 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.^{56,57}

Increased endocytosis is an important mechanism involved in junction disassembly during intestinal inflammation.⁴ Internalization of cell-surface proteins – including transmembrane TJ proteins⁵⁸ – involves several pathways leading to either their recycling or degradation. In addition, ubiquitination is a crucial post-translational modification of transmembrane proteins regulating their endocytosis, trafficking and ultimately their cell surface level.^{46,47} Phosphorylation of several TJ proteins including occludin⁵⁹ has been associated with their ubiquitination.⁶⁰ 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 7c). 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 IQGAP1,⁶¹ the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs),⁶² as well as the bitter receptor T2R38.⁶³ 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-C12.⁶¹

We previously demonstrated that 3-oxo-C12:2 AHL is lost in IBD patients, especially during flare.²³ 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.²³ 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.

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

Acknowledgments

We would like to thank Frédérick Barreau for numerous advice, Jean-Pierre Hugot and Maryline Roy for THP-1 cells, Agathe Peyrottes for her help on chemistry points 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 the Association François Aupetit (AFA); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Sorbonne Université; Ecole Pratique des Hautes Etudes. DA was the recipient of a fellowship from CORDDIM Ile de France.

Disclosure of interest

Professor Seksik has received personal fees from Takeda, Merck MSD, Biocodex, Ferring, Mayoly Spindler, Astellas, Amgen and Abbvie but has no conflict of interest linked to this work. The remaining authors disclose no conflict.

Funding

THIS WORK WAS SUPPORTED BY THE INSERM; ASSOCIATION FRANÇOIS AUPETIT; CORDDIM ILE DE FRANCE; SORBONNE UNIVERSITE; EPHE.

ORCID

Barbara G. Postal  <http://orcid.org/0000-0002-6505-2018>
 Céline Osinski  <http://orcid.org/0000-0003-4897-8510>
 Daniel Stockholm  <http://orcid.org/0000-0002-5069-5256>
 Véronique Carrière  <http://orcid.org/0000-0002-6263-0847>
 Sophie Thenet  <http://orcid.org/0000-0002-0336-2942>

References

1. Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006;22:85–89. doi:10.1097/01.mog.0000203864.48255.4f.
2. Buckley A, Turner JR. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10:a029314.doi: 10.1101/cshperspect.a029314.
3. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17:564–580. doi:10.1038/nrm.2016.80.

Let-

- 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. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.03.007.
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(1):283–309. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142150.
 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. doi:10.1152/ajpgi.00055.2011.
 7. Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Gunzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell.* 2009;20(16):3713–3724. doi:10.1091/mbc.e09-01-0080.
 8. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11:1075–1083. doi:10.1016/j.cgh.2013.07.001.
 9. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:329–342. doi:10.1038/nri3661.
 10. Luissint AC, Parkos CA, Nusrat A. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair. *Gastroenterology.* 2016;151:616–632. doi:10.1053/j.gastro.2016.07.008.
 11. 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;105:883–885. doi:10.7326/0003-4819-105-6-883.
 12. 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. doi:10.1093/ecco-jcc/jjx180.000.
 13. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet.* 1993;341:1437–1439. doi:10.1016/0140-6736(93)90882-H.
 14. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J-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. doi:10.1136/gut.2006.094375.
 15. Krug SM, Bojarski C, Fromm A, Lee IM, Dames P, Richter JF, Turner JR, Fromm M, Schulzke J-D. Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor alpha2, affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis. *Mucosal Immunol.* 2018;11:345–356. doi:10.1038/mi.2017.52.
 16. Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, Fantini M, Sturm A, Borroni E, Repici A, et al. Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2008;135(1):173–184. doi:10.1053/j.gastro.2008.04.002.
 17. Vivinus-Nebot M, Frin-Mathy G, Bziouche H, Dainese R, Bernard G, Anty R, Filippi J, Saint-Paul MC, Tulic MK, Verhasselt V, et al. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut.* 2014;63(5):744–752. doi:10.1136/gutjnl-2012-304066.
 18. 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(1):33–46. doi:10.1016/j.jcmgh.2017.03.007.
 19. Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(4):223–237. doi:10.1038/s41575-019-0258-z.
 20. Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(6):371–382. doi:10.1038/s41579-019-0186-5.
 21. Pacheco AR, Sperandio V. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr Opin Microbiol.* 2009;12(2):192–198. doi:10.1016/j.mib.2009.01.006.
 22. Kaper JB, Sperandio V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 2005;73(6):3197–3209. doi:10.1128/IAI.73.6.3197-3209.2005.
 23. Landman C, Grill JP, Mallet JM, Marteau P, Humbert L, Le Balc'h E, Maubert M-A, Perez K, Chacara W, Brot L, 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. doi:10.1371/journal.pone.0202587.
 24. Golovkine G, Reboud E, Huber P. *Pseudomonas aeruginosa* takes a multi-target approach to achieve junction breach. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:532. doi:10.3389/fcimb.2017.00532.
 25. 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. doi:10.1159/000494069.
 26. 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;580:6921–6928.

27. 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;315:313–326. doi:10.1016/j.yexcr.2008.10.044.
28. 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. doi:10.1152/ajpgi.00016.2014.
29. 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. *Eur J Cell Biol.* 2010;89:584–597. doi:10.1016/j.ejcb.2010.03.002.
30. 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;166:409–419. doi:10.1016/S0002-9440(10)62264-X.
31. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788:864–871. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.027.
32. Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A. 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.
33. Petit CS, Barreau F, Besnier L, Gandille P, Riveau B, Chateau D, Roy M, Berrebi D, Svrcek M, Cardot P, et al. Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2012;143(1):122–32 e15. doi:10.1053/j.gastro.2012.03.029.
34. Ghezal S, Postal BG, Quevrain E, Brot L, Seksik P, Leturque A, Thenet S, Carrière V. Palmitic acid damages gut epithelium integrity and initiates inflammatory cytokine production. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(2):158530. doi:10.1016/j.bbalip.2019.158530.
35. 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;202:767–776. doi:10.1002/jcp.20173.
36. Kravchenko VV, Kaufmann GF, Mathison JC, Scott DA, Katz AZ, Wood MR, Brogan AP, Lehmann M, Mee JM, Iwata K, et al. N-(3-oxo-acyl)homoserine lactones signal cell activation through a mechanism distinct from the canonical pathogen-associated molecular pattern recognition receptor pathways. *J Biol Chem.* 2006;281(39):28822–28830. doi:10.1074/jbc.M606613200.
37. Charlton TS, de Nys R, Netting A, Kumar N, Hentzer M, Givskov M, Kjellerberg, S. 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. *Environ Microbiol.* 2000;2:530–541. doi:10.1046/j.1462-2920.2000.00136.x.
38. Jung C, Meinzer U, Montcuquet N, Thachil E, Chateau D, Thiebaut R, Roy M, Alnabhani Z, Berrebi D, Dussaillant M, et al. *Yersinia pseudotuberculosis* disrupts intestinal barrier integrity through hematopoietic TLR-2 signaling. *J Clin Invest.* 2012;122(6):2239–2251. doi:10.1172/JCI58147.
39. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, et al. QuPath: open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):16878. doi:10.1038/s41598-017-17204-5.
40. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:671–675. doi:10.1038/nmeth.2089.
41. Su L, Nalle SC, Shen L, Turner ES, Singh G, Breskin LA, Khramtsova EA, Khramtsova G, Tsai P, Fu Y, et al. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology.* 2013;145(2):407–415. doi:10.1053/j.gastro.2013.04.011.
42. Clayburgh DR, Barrett TA, Tang Y, Meddings JB, Van Eldik LJ, Watterson DM, Clarke, LL, Mrsny, RJ, Turner, JR. Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *J Clin Invest.* 2005;115:2702–2715. doi:10.1172/JCI24970.
43. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Weber CR, Schwarz BT, Austin JR 2nd, Raleigh DR, Guan Y, Watson AJM, Montrose MH, et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol.* 2010;189:111–126. doi:10.1083/jcb.200902153.
44. Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, Parkos, CA, Nusrat, A. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell.* 2005;16:5040–5052.
45. Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J, Anderson JM. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci.* 2010;123:2844–2852. doi:10.1242/jcs.065581.
46. Foot N, Henshall T, Kumar S. Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins. *Physiol Rev.* 2017;97:253–281. doi:10.1152/physrev.00012.2016.

47. Tanno H, Komada M. The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway. *J Biochem.* 2013;153:497–504. doi:10.1093/jb/mvt028.
48. Jennek S, Mittag S, Reiche J, Westphal JK, Seelk S, Dorfel MJ, Pfirrmann T, Friedrich K, Schütz A, Heinemann U, et al. Tricellulin is a target of the ubiquitin ligase Itch. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1397(1):157–168. doi:10.1111/nyas.13349.
49. Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F, Bauer H-C, Bauer H. The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem.* 2002;277:10201–10208. doi:10.1074/jbc.M111384200.
50. Piper RC, Dikic I, Lukacs GL. Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6:a016808. doi: 10.1101/cshperspect.a016808.
51. Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, Standiford TJ, Ishiguro M, Yamaguchi K. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun.* 2003;71:5785–5793. doi:10.1128/IAI.71.10.5785-5793.2003.
52. Tao S, Luo Y, Bin H, Liu J, Qian X, Ni Y, Zhao R. 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. doi:10.1038/srep28778.
53. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14:9–21.
54. Taguchi R, Tanaka S, Joe GH, Maseda H, Nomura N, Ohnishi J, Ishizuka S, Shimizu, H, Miyazaki, H. 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. doi:10.1152/ajpcell.00271.2013.
55. Neely AM, Zhao G, Schwarzer C, Stivers NS, Whitt AG, Meng S, Burlison, JA, Machen, TE, Li, C. N-(3-Oxoacyl)-homoserine lactone induces apoptosis primarily through a mitochondrial pathway in fibroblasts. *Cell Microbiol.* 2018;20:e12787. doi: 10.1111/cmi.12787.
56. Buschmann MM, Shen L, Rajapakse H, Raleigh DR, Wang Y, Wang Y, Lingaraju A, Zha J, Abbott E, McAuley EM, 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(19):3056–3068. doi:10.1091/mbc.e12-09-0688.
57. Elias BC, Suzuki T, Seth A, Giorgianni F, Kale G, Shen L, Turner JR, Naren A, Desiderio DM, Rao R, 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(3):1559–1569. doi:10.1074/jbc.M804783200.
58. 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(1):54–65. doi:10.1111/nyas.13346.
59. Dorfel MJ, Huber O. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:807356. doi:10.1155/2012/807356.
60. 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;284:21036–21046. doi:10.1074/jbc.M109.016766.
61. Karlsson T, Turkina Mv F, Yakymenko O, Yakymenko O F, Magnusson K-E, Magnusson Ke F, Vikstrom E, Vikstrom E. The *Pseudomonas aeruginosa* N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration. *PLoS Pathog.* 2012. doi:10.1371/journal.ppat.1002953.
62. Jahoor A, Patel R, Bryan A, Do C, Krier J, Watters C, Wahli W, Li G, Williams SC, Rumbaugh KP, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors mediate host cell proinflammatory responses to *pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *J Bacteriol.* 2008;190(13):4408–4415. doi:10.1128/JB.01444-07.
63. Maurer S, Wabnitz GH, Kahle NA, Stegmaier S, Prior B, Giese T, Gaida MM, Samstag Y, Hänsch GM. 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. doi:10.3389/fimmu.2015.00369.

C. Résultats complémentaires

1. Effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur un panel de cytokines

Dans l'article Coquant *et al*, nous avons mis en évidence des effets anti-inflammatoires de la 3-oxo-C12:2-HSL sur les cellules immunitaires impliquant notamment la voie JAK-STAT et les récepteurs du goût amer. Préalablement à cette étude, afin de pouvoir évaluer largement les effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur l'inflammation des cellules eucaryotes, nous avons réalisé une analyse multiplexe d'un panel de cytokines. L'inflammation était déclenchée dans les cellules RAW264.7 par une combinaison de LPS (10ng/mL) et d'IFN γ (20U/mL).

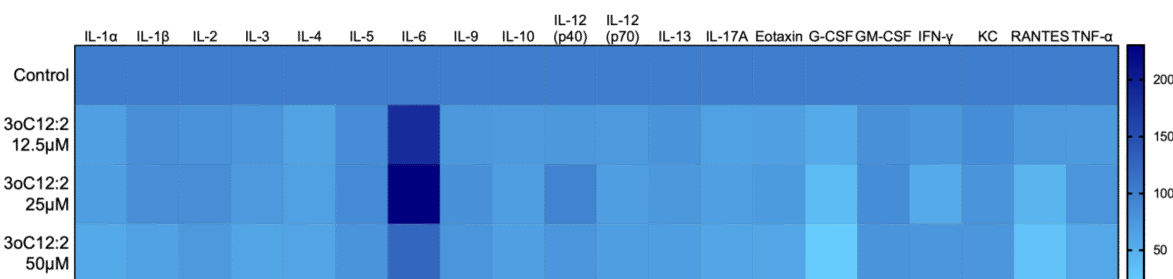


Figure 23 : Effets de la 3-oxo-C12 :2-HSL sur la sécrétion d'un panel de cytokines par les RAW264.7

Les cellules RAW264.7 en conditions pro-inflammatoires avec une combinaison de LPS (10ng/mL) et d'IFN γ (20U/mL) ont été exposées pendant 6 heures à la 3-oxo-C12:2-HSL aux concentrations indiquées et vingt cytokines et chimiokines ont été mesurées dans le surnageant de culture par multiplex protéique (Biorad, Bio-Plex Pro Mouse cytokine standard 23-plex group1). Les données ont été normalisées au contrôle (100%) et sont représentées sous forme de *heatmap* (l'échelle en pourcentage est montrée à droite). Chaque point est la moyenne d'un triplicat d'une expérience unique

Plusieurs cytokines pro-inflammatoires étaient diminuées en présence de 3-oxo-C12:2-HSL, dont l'IL-1 β , l'IL-12, RANTES et le TNF α (Figure 23). En revanche, de façon surprenante, l'IL-6 était augmentée. Ces effets étaient dose-dépendants et étaient maximal à 50 μ M. Aucune cytotoxicité n'a été observée aux concentrations utilisées.

Les résultats de cette analyse multiplexe ont été confirmés par ELISA et qPCR pour une sélection de cytokines, et présentés dans l'article en cours de soumission à *Scientific reports*. Ces données nous ont permis de mieux comprendre et confirmer le rôle de la 3-oxo-C12:2-HSL sur l'inflammation et nous ont conduit à étudier les mécanismes impliqués dans l'effet anti-inflammatoire, comme décrit dans l'article soumis cité précédemment.

2. Effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur la composition du microbiote à l'état basal

Afin d'étudier les effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur un modèle intégré prenant en compte des paramètres plus physiologiques, nous avons mené des expériences *in vivo* avec des souris. Ces premières expériences ont été réalisées dans le cadre de la thèse de Doriane Aguanno, en collaboration avec Florian Chain de l'institut MICALIS (Institut national de recherche pour

l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, INRAE, Jouy-en-Josas). L'objectif était d'étudier les effets de deux AHLs (la 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa* et la 3-oxo-C12:2-HSL) sur la sévérité d'une colite induite chimiquement au DSS.

Dans le but d'étudier les effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur la composition du microbiote à l'état basal, nous avons utilisé les souris contrôle des expériences de Doriane Aguanno. Les souris ont reçu quotidiennement les AHLs par gavage intra-gastrique pendant 7 jours.

i. Les AHLs atteignent-elles le côlon ?

Dans un premier temps, nous nous sommes demandés si les molécules 3-oxo-C12:2-HSL et la 3-oxo-C12-HSL, apportées par gavage intra-gastrique, étaient capables d'atteindre le côlon, organe cible dans une colite inflammatoire.

Pour doser les AHLs chez les souris, nous avons collaboré avec Raphaël Lami *et alice* Rodrigues du Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (Observatoire Océanographique de Banyuls-Sur-Mer, Sorbonne Université). A partir du protocole utilisé par notre équipe pour isoler et caractériser la 3-oxo-C12:2-HSL des fèces humaines (Landman *et al*, 2018), nous avons optimisé les conditions pour doser les AHLs dans les fèces, cæcums et sérums des souris par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

Les échantillons solides ont été lyophilisés, pesés et une extraction solide-liquide a été réalisée au **méthanol**. Concernant les échantillons liquides, nous avons réalisé une extraction liquide-liquide à l'**acétate d'éthyle**, suivant un protocole utilisé en routine par le laboratoire de Banyuls à partir de culture bactérienne mais aussi décrit dans une publication utilisant du sérum de souris (Dal Bello *et al.*, 2020).

Nous avons détecté et quantifié la 3-oxo-C12:2-HSL et la 3-oxo-C12-HSL dans les fèces des souris ayant reçu les molécules respectives (Figure 24). Cependant, la détection n'a été possible que sur une partie des échantillons (3 échantillons sur un total de 12). Une explication possible est que les échantillons ont été collectés entre 2 ans et 6 mois avant le dosage des AHLs. Bien que conservés à -80°C, il est possible que certains échantillons se soient dégradés. Les formes dégradées n'ont pas été quantifiées, mais il est envisageable de les doser dans des expériences futures. Néanmoins, ce résultat nous a permis de valider ce mode d'apport des AHLs en montrant qu'au moins une partie des molécules atteint le côlon sans être dégradée et ainsi d'interpréter les expériences menées chez la souris.

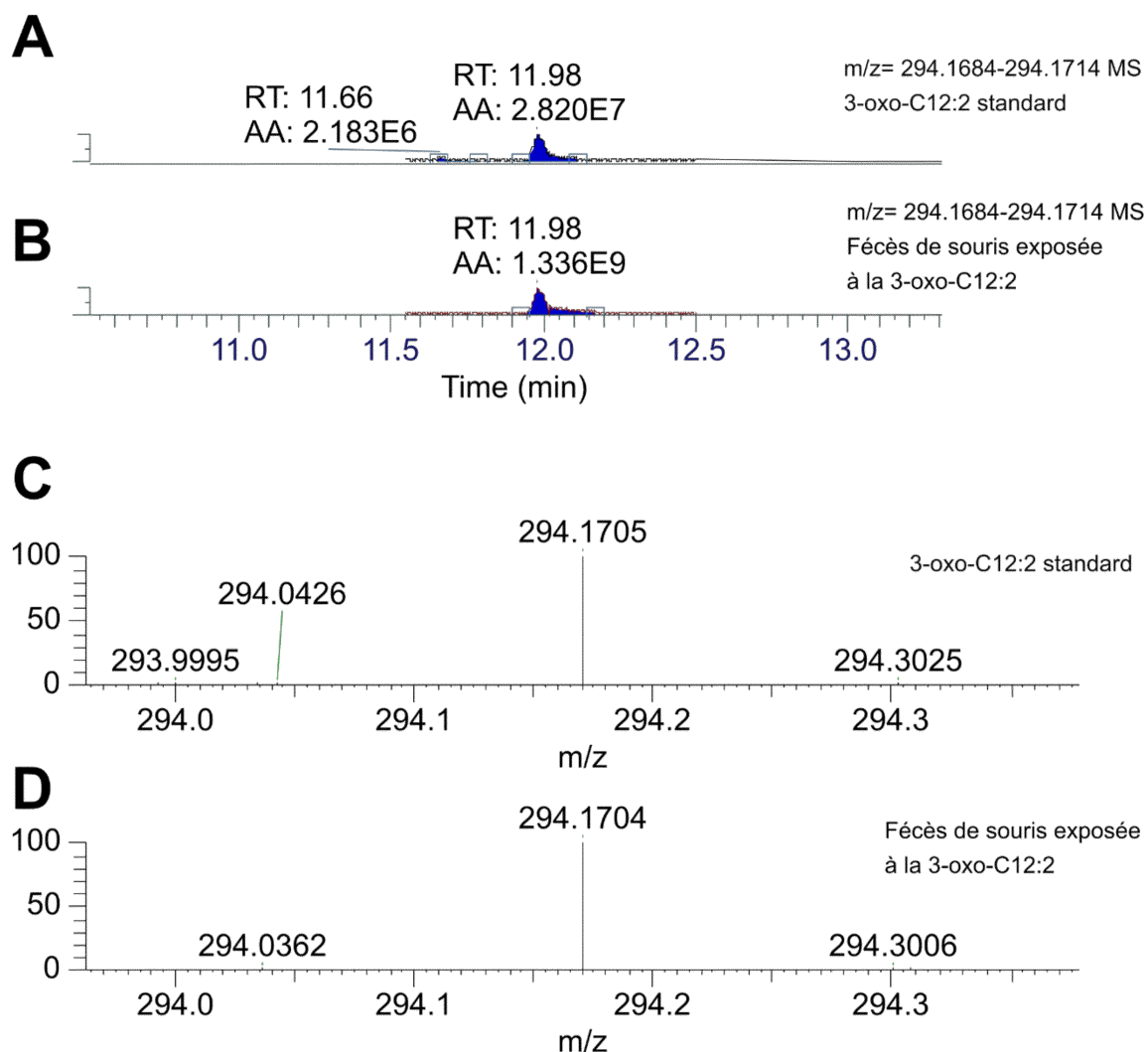


Figure 24 : Présence de la 3-oxo-C12:2-HSL dans les fèces d'une souris gavée avec cette AHL

Les souris ont été gavées en intra-gastrique quotidiennement pendant 7 jours avec la 3-oxo-C12:2-HSL. Les fèces ont été collectées à 7 jours, lyophilisées et une extraction solide-liquide a été réalisée au méthanol. **A** : Chromatogramme du standard 3-oxo-C12:2-HSL; **B** : Chromatogramme de l'échantillon extrait; **C** : Spectre de masse du standard 3-oxo-C12:2-HSL **D** : Spectre de masse scan de l'échantillon extrait. Les échantillons sont analysés par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide par ion secondaire (LC-MS SIM) en injectant 7µL. Analyse des données *via* FreeStyle ThermoFisher. RT : temps de rétention ; AA : aire sous la courbe du pic ; m/z : masse sur charge

ii. Les AHLs modifient-elles la composition du microbiote à l'état basal ?

Étant donné que les AHLs sont des molécules du dialogue bactérien, nous nous sommes posés la question de l'effet de ces molécules sur la composition du microbiote. Au vu de l'absence d'effet clair des AHLs sur la sévérité de la colite chez les souris traitées au DSS, nous nous sommes concentrés sur l'impact des AHLs sur la composition du microbiote des souris à l'état basal, c'est-à-dire sans inflammation. Nous avons séquencé l'ADN ribosomique 16S des fèces des souris des trois expériences afin de comparer les microbiotes entre le jour initial (J0) et le jour 7 (J7) (Figure 25 et 26).

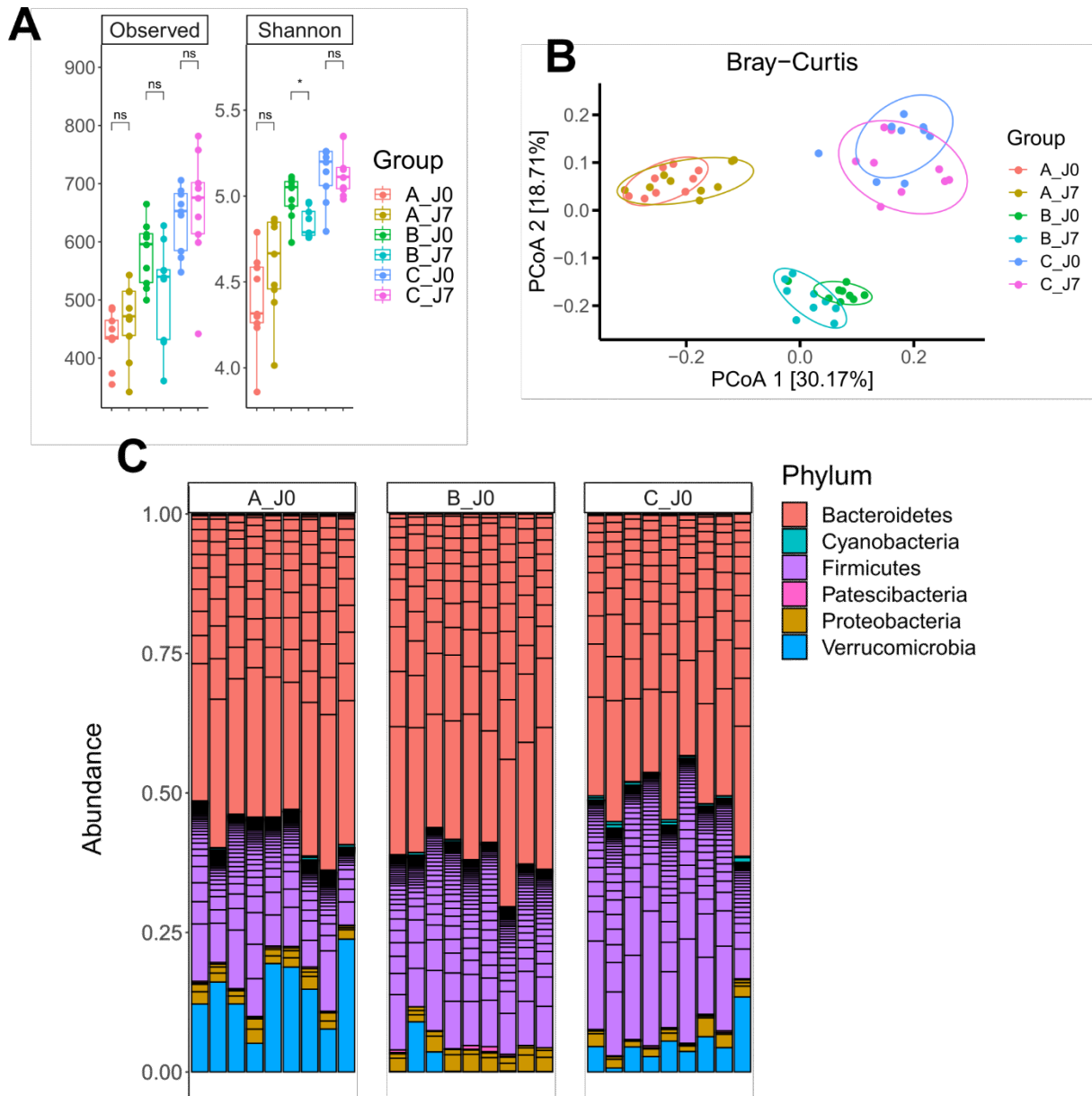


Figure 25 : Variabilité du microbiote indépendamment des traitements

Les fèces des souris ont été récoltées au jour initial (J0) des expériences. L'ADN des fèces a été extrait et l'ADN ribosomique 16S a été séquencé puis analysé. **A** : Diversité alpha sur la diversité en OTU du microbiote fécal pour chacune des expériences A, B et C. Résultats exprimés sous forme de boîte à moustache représentant la médiane et les quartiles des données. Les moustaches représentent 1.5 fois l'écart interquartile. (n=6 par condition, t-test, *p<0.05) ; **B** : Diversité beta : analyse en composantes principales basée sur la matrice de distance de Bray-Curtis, permettant de discriminer 3 groupes ; **C** : Taxonomie des phyla des trois expériences à J0. **A, B et C** représentent trois expériences menées indépendamment. Les séquences de l'ADN ribosomique 16S ont été analysées avec le logiciel QIIME2 avec le pipeline DADA2. Puis, les séquences ont été alignées avec les séquences de la base de données SILVA avec le logiciel R et les packages Phyloseq et metagenomeSeq, les figures sont générées sous R.

La figure 25 compare la composition du microbiote des trois expériences (A, B et C) qui ont été menées indépendamment. L'analyse de la diversité alpha met en évidence une variabilité très importante entre les trois expériences (Figure 25A). De plus, l'analyse de la diversité bêta révèle une séparation en trois groupes : les différences d'abondances entre les différents échantillons d'une même expérience sont faibles, mais très importantes entre les trois expériences (Figure 25B). La figure 25C nous permet de comparer la composition au niveau des phyla au début des expériences. La composition en Verrucomicrobia et Protéobacteria varie non seulement entre les trois expériences mais aussi entre les groupes expérimentaux. Ces différences ont rendu difficile l'analyse des changements de populations bactériennes suite à des traitements.

Lors de deux expériences, nous avons testé les effets des AHLs 3-oxo-C12-HSL et 3-oxo-C12:2-HSL sur le microbiote des souris à l'état basal. L'analyse de la diversité alpha et beta ne souligne aucune tendance de variation entre les trois groupes expérimentaux (Figure 26A et B). En revanche, la diversité bêta démontre que deux clusters sont formés, représentant chacun une expérience. Aucune tendance franche n'est observable dans la variation des phyla entre les trois groupes de traitement (Figure 26C). Les souris exposées à la 3-oxo-C12:2-HSL dans l'expérience A ont une diminution des Verrucomicrobia tandis que l'on observe la tendance inverse dans l'expérience B.

En résumé, ces données ne permettent pas de conclure que la 3-oxo-C12 :2-HSL ou la modulent significativement la composition du microbiote.

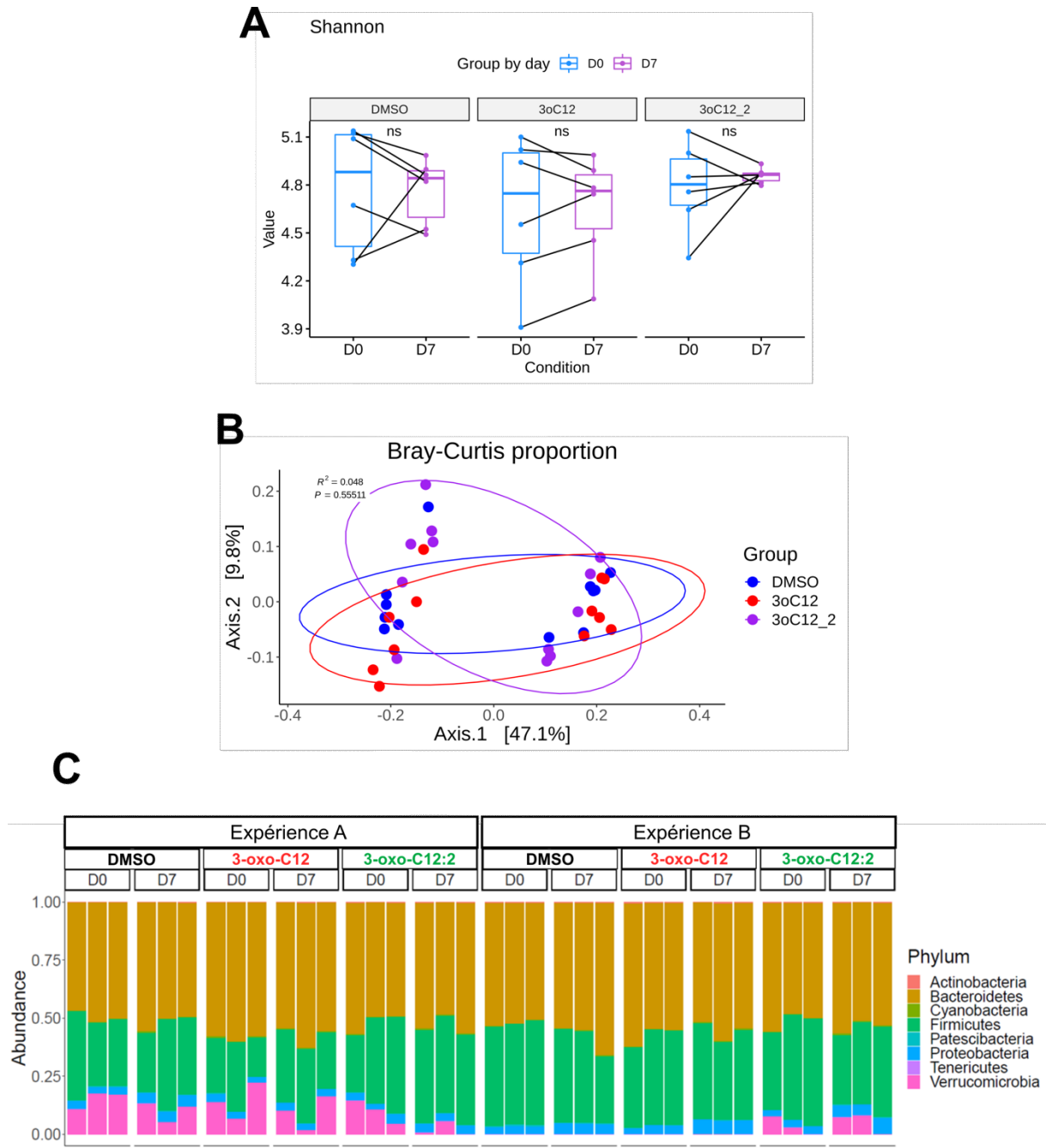


Figure 26 : Impact des AHLs sur la composition du microbiote bactérien

Les souris ont été gavées en intra gastrique quotidiennement à la 3-oxo-C12:2-HSL ou à la 3-oxo-C12-HSL avec 10mg/kg. Les feces ont été récolté au jour initial (J0) et après 7 jours de gavage (J7). L'ADN des fécès a été extrait et l'ADN ribosomique 16S a été séquencé puis analysé. **A** : Diversité alpha sur la diversité en OTU du microbiote fécal pour les deux expériences A et B. Résultats exprimés sous forme de boîte à moustache représentant la médiane et les quartiles des données. Les moustaches représentent 1,5 fois l'écart interquartile. (n=6 par condition, t-test) ; **B** : Diversité beta : analyse en composantes principales basée sur la matrice de distance de Bray-Curtis, permettant de discriminer 3 groupes ; **C** : Taxonomie des phyla des trois expériences à J0. **A** et **B** représentent deux expériences menées indépendamment. Les séquences de l'ADN ribosomique 16S ont été analysées avec le logiciel QIIME2 avec le pipeline DADA2. Puis, les séquences ont été alignées avec les séquences de la base de données SILVA avec le logiciel R et les packages Phyloseq et metagenomeSeq, R a été également utilisé pour faire les figures

II- Impact de l'ACP, molécule synthétique, sur l'homéostasie intestinale

A. Effets *in vitro* de l'ACP

En collaboration avec l'équipe de Jean-Maurice Mallet, des analogues synthétiques de AHLs ont été synthétisés. Une des molécules ayant les effets anti-inflammatoires les plus prometteurs a été sélectionnée et fait l'objet d'une publication (Peyrottes *et al*, 2020, en annexe).

Après avoir observé des effets anti-inflammatoires puissants de l'analogue synthétique d'AHL ACP sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules entérocytaires Caco-2/TC7 et sur la sécrétion d'IL-6 par les macrophages RAW264.7, nous avons voulu caractériser ces effets et comprendre ses mécanismes d'action. Pareillement à la 3-oxo-C12:2-HSL, nous avons mesuré par analyse multiplexe les effets de l'ACP sur un panel de cytokines. L'expérience a été conduite sur le même modèle cellulaire, les macrophages murins RAW264.7, stimulés par de l'IFN γ et du LPS.

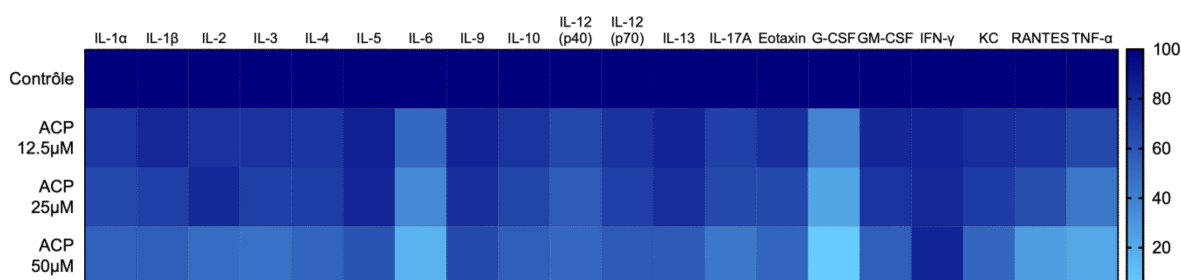


Figure 27 : Effets de l'ACP sur la sécrétion d'un panel de cytokines par les RAW264.7 sous forme de heatmap

Les cellules RAW264.7 en conditions pro-inflammatoires avec une combinaison de LPS (10ng/mL) et d'IFN γ (20U/mL) ont été exposées pendant 6 heures à l'ACP aux concentrations indiquées et vingt cytokines et chimiokines ont été mesurées dans le surnageant de culture par multiplex protéique (Biorad, Bio-Plex Pro Mouse cytokine standard 23-plex group1). Les données ont été normalisées au contrôle (100%) et sont représentées sous forme de heatmap (l'échelle en pourcentage est montrée à droite). Chaque point est la moyenne d'un triplicat d'une expérience unique

L'étude par multiplex protéique a révélé que l'ACP **diminuait de nombreuses cytokines, dont l'IL-6, le G-CSF, RANTES et le TNF α** (Figure 27).

Ces résultats ont été confirmés par ELISA (Figure 28 et 29). En présence d'ACP, les RAW264.7 sécrètent moins d'IL-1 β , d'IL-6, de RANTES et de TNF α par rapport au contrôle (Figure 28 A, B, C et D). Ce résultat était dose-dépendant avec un effet maximum à la concentration de **50 μ M**. Toutes les doses d'ACP supérieures à 50 μ M entraînaient une augmentation de la mort cellulaire, contrôlée par la mesure du relargage de LDH (non montré). Nous avons pu observer les mêmes effets au niveau des taux d'ARNm, après avoir exposé les cellules pendant deux heures à 50 μ M d'AHL (Figure 28E, F, G et H).

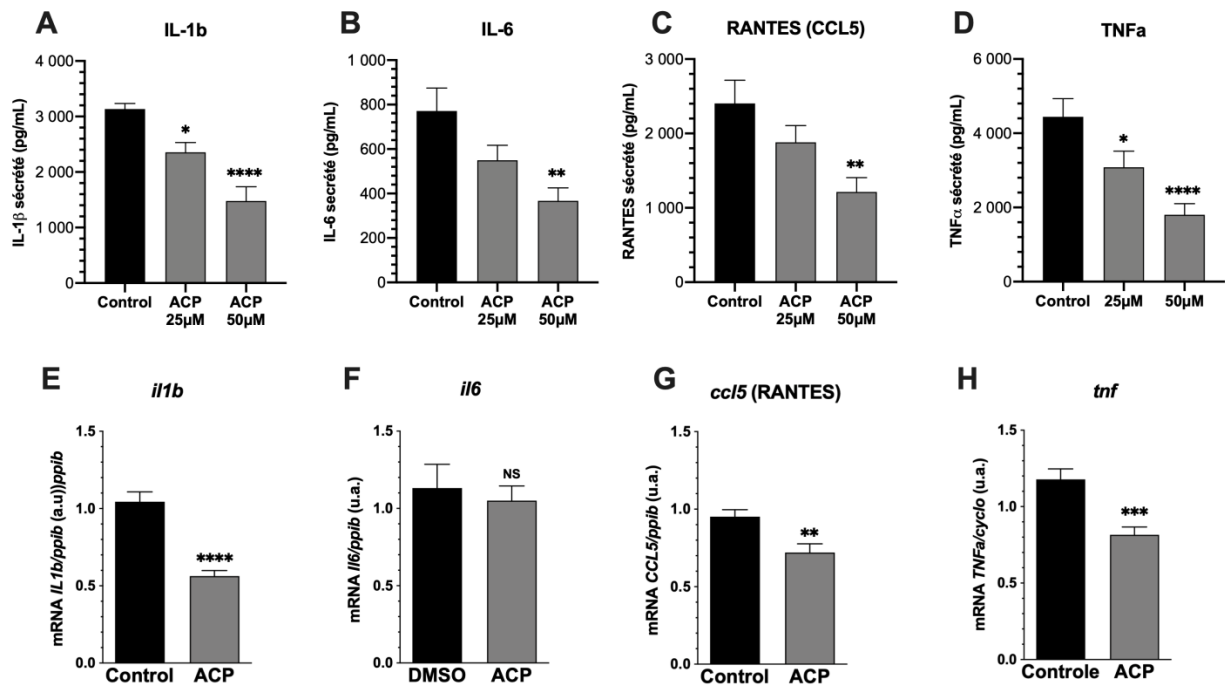


Figure 28 : L'ACP diminue l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages murins RAW264.7

Les cellules RAW264.7 ont été exposées à l'ACP, à 25μM et 50μM pendant 6h pour doser les cytokines dans le surnageant à l'aide de kits ELISA (Biotechne, Duoset) (A, B, C et D) et à 50μM pendant 2h pour mesurer l'expression génique par RT-qPCR (E, F, G et H). A, B : one-way ANOVA, Dunnett's post test ; C, D : Kruskal Wallis Dunn's post test ; E, F, G et H : unpaired t test. Moyenne ± SEM * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001 vs. contrôle.

Nous avons également voulu évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'ACP sur un modèle plus physiologique, les cellules mononucléées issues du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cell* - **PBMC**).

En présence de LPS et d'ACP, il y a une forte diminution de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire **TNF-α** par les PBMC, de façon dose-dépendante (Figure 29), sans augmentation de la cytotoxicité par rapport au contrôle (mesure du relargage de LDH dans le surnageant, données non montrées).

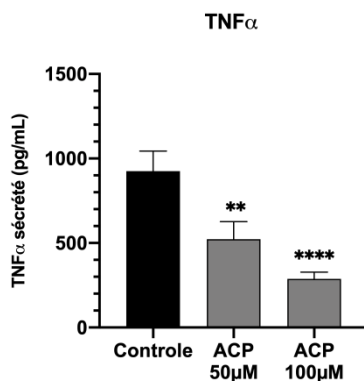


Figure 29 : L'ACP diminue la sécrétion de TNFα par les cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC)

Les PBMC de sujets sains (isolé de sang de donneurs anonymes de l'établissement Français du Sang) ont été isolés par gradient de Ficoll et exposés pendant 24h aux doses indiquées d'ACP, en conditions inflammatoires déclenchées par 10ng/mL de LPS. La sécrétion de TNFα a été mesurée par ELISA (kit ?).

One-way ANOVA, Dunnett's post test ; Moyenne ± SEM ** P<0.01, **** P<0.0001 vs. Contrôle (n = 12 sujets testés en triplicats)

Pareillement à la 3-oxo-C12:2-HSL, nous avons étudié les effets de l'ACP sur le **transcriptome** des macrophages murins RAW264.7 en conditions pro-inflammatoires (Figure 30). Globalement, 539 gènes étaient différentiellement régulés à la baisse par l'ACP et 378 différentiellement augmentés (Figure 30A). Peu de voies cellulaires modulées ont été identifiées par l'analyse du transcriptome en soumettant les données à la base KEGG (Figure 30B). La voie de l'inflammation JAK-STAT était diminuée, ainsi que le cluster de gènes impliqués dans les interactions cytokines-récepteurs de cytokines. En analysant les gènes différentiellement régulés par la base de données GO (figure 30C), un plus grand nombre de termes étaient significatifs, dont plusieurs liés à une diminution de la réponse inflammatoire, mais aussi liés à la voie NF- κ B et aux TLR.

Un nombre plus faible de voies sont diminuées à la baisse en présence d'ACP par rapport à la 3-oxo-C12:2-HSL (Voir l'article principal), mais certaines voies sont communes telles que JAK-STAT ou NF- κ B.

Nous avons également évalué les **effets de l'ACP sur la fonction de barrière**, dans le modèle entérocytaire Caco-2/TC7, dans des conditions identiques à celles pour lesquelles nous avons testé la 3-oxo-C12:2-HSL, en soumettant les cellules aux cytokines pro-inflammatoires TNF α et IFN γ (Aguanno *et al*, 2020). Nous n'avons pas observé d'effets de l'ACP à 150 μ M, que ce soit sur la mortalité cellulaire, la perméabilité aux macromolécules (via la mesure du traceur fluorescent FD4) ou la perméabilité aux ions (via la mesure de la résistance électrique trans-épithéliale).

En résumé, la molécule analogue ACP exerce des effets sur l'inflammation des cellules immunitaires, mais les mécanismes impliqués semblent différents de ceux de engagés par la 3-oxo-C12:2-HSL. Par ailleurs, contrairement à la molécule naturelle, la molécule synthétique ne semble pas induire d'effets protecteurs sur les jonctions inter-cellulaires.

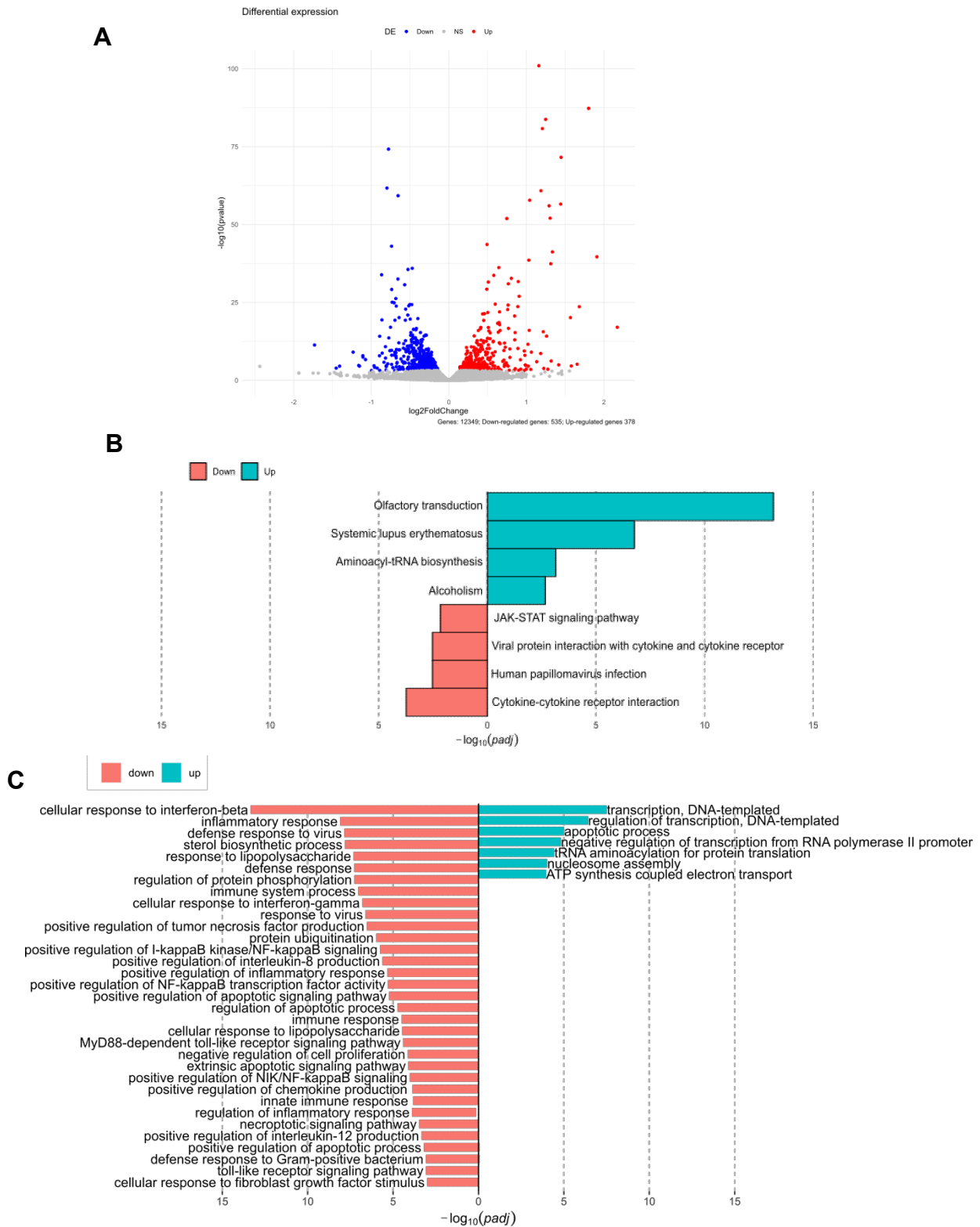


Figure 30: L'ACP module l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation par les RAW264.7

Les macrophages murins RAW264.7 ont été exposés à l'ACP pendant deux heures en conditions pro-inflammatoires avec du LPS (10ng/mL) et de l'IFN γ (20U/mL) avec 50 μ M d'ACP. L'ARN a été isolé sur colonnes (RNeasy minikit, Qiagen), la qualité des ARN a été mesurée sur des puces (NanoChip, Agilent). Le séquençage a été fait à la plateforme de l'Institut du Cerveau et de la Moelle osseuse (KAPA mRNA HyperPrep Kit, ROCHE) les échantillons ont été séquençés sur un appareil ILLUMINA Novaseq 6000, à 2x28 Millions de 100 lectures de base par échantillon. **A** : Volcano plot des gènes différentiellement régulés par l'ACP **B** : L'ACP module plusieurs voies cellulaires issues de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). **C** : L'ACP module de nombreux termes issus de GO (Gene Ontology)

B. Effets des AHLs *in vivo* dans un modèle de colite inflammatoire chez la souris

1. Mise au point des conditions expérimentales

Un de nos objectifs était de tester l'impact de l'ACP, analogue des AHLs, sur un modèle global et prenant en compte un plus grand nombre de paramètres que des cellules *in vitro*. Ces expériences ont été réalisées à la plateforme d'hébergement et d'expérimentation animale (PHEA) du Centre de Recherche Saint-Antoine.

Dans un premier temps, nous avons cherché les conditions permettant d'induire une colite inflammatoire modérée, afin de pouvoir observer l'effet des traitements aux AHLs qui ne soient pas masqués par une maladie trop intense. Nous avons induit la colite grâce à un agent chimique abrasif, le Dextran Sulfate Sodium (DSS) de 36-50kDa, à des souris C57BL/6J de 8 semaines. Le DSS agit principalement dans le côlon et déclenche une inflammation apparentée à la RCH (Chassaing *et al.*, 2014). Étant donné que les effets dépendent de la dose, du fournisseur et du lot du produit, nous avons testé différentes doses de DSS pour optimiser le protocole.

Nous avons décidé d'administrer le DSS en continu pendant 7 à 8 jours dans l'eau de boisson, sans période de récupération afin de prélever les organes en période d'inflammation. Des doses croissantes de DSS ont été administrées, de 1% à 2.5% (Figure 29). Le score de la maladie a été déterminé selon un barème utilisé en routine par notre équipe et établi d'après deux publications (Chassaing *et al.*, 2014; Schultz *et al.*, 2004). Le tableau 7 résume l'échelle de score apprécié quotidiennement, accompagnée de la mesure du poids. Nous avons de plus mesuré la longueur du côlon à la fin de l'expérience, qui est un paramètre modulé par le DSS (Chassaing *et al.*, 2014).

	Description	Score
Diarrhée	Consistance normale	0
	Consistance molle	2
	Consistance liquide	4
Sang dans les feces	Aucun	0
	Leger saignement	2
	Saignement abondant	4
Perte de Poids	<1%	0
	1-5%	1
	5-10%	2
	10-15%	3
	>15%	4
Score d'activité de la colite sur 12 :		Addition des trois scores

Tableau 7 : Barème utilisé pour établir le score de la colite inflammatoire déclenchée par le DSS. D'après Schultz *et al.*, 2004

Nous avons obtenu une réponse dont la sévérité était corrélée à la dose comme attendu (Figure 31A). La **dose de 2%** a été choisie pour les expériences ultérieures, au vu du score de la maladie qui était modéré, ainsi qu'à une perte de poids raisonnable (Figure 31B). De plus, la longueur du côlon était diminuée en présence de 2% de DSS (Figure 31C).

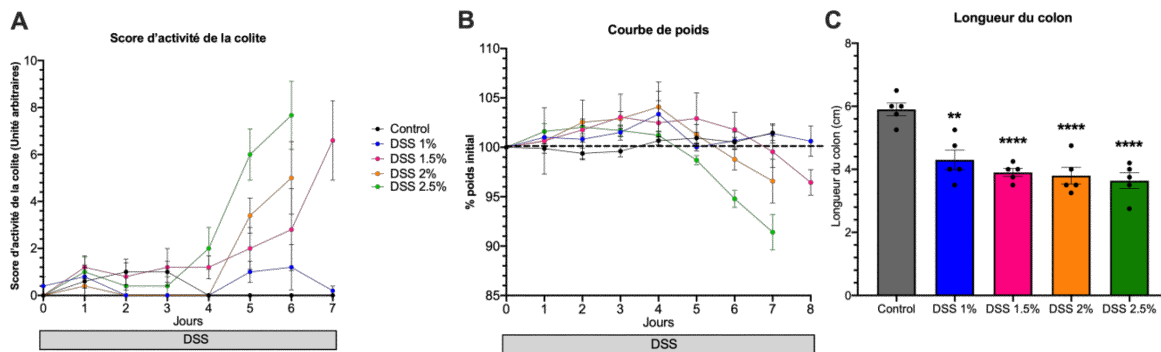


Figure 31 : Mise au point de la dose de Dextran Sulfate Sodium (DSS) pour induire une colite inflammatoire modérée chez la souris

Les souris (n= 5 par condition) ont reçu du DSS dans l'eau de boisson pendant 7 à 8 jours. Le score d'activité de la maladie a été établi selon le tableau 7. Les souris ont été scorées et pesées quotidiennement. A la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés et le côlon a été prélevé et mesuré afin d'évaluer la gravité de la maladie. Moyenne \pm SEM B: One-Way ANOVA Dunnett's post test *** P<0.001, **** P<0.0001 vs. Contrôle

2. Effets des AHLs dans un modèle de colite inflammatoire

Nous avons gavé quotidiennement en intra-gastrique les souris avec les AHLs, l'ACP ou de la 3-oxo-C12:2-HSL à 10mg/kg diluées dans le DMSO à 0.1%. En parallèle, les souris ont reçu du DSS à 2% dans l'eau de boisson. Nous avons établi tous les jours le score de la colite, ainsi que la courbe de poids.

Après 7 jours d'induction de la maladie, nous avons administré par gavage intra-gastrique un traceur fluorescent, le FITC-4kDa (FD4), nous permettant d'évaluer la perméabilité intestinale. Quatre heures après le gavage, nous avons prélevé le sang périphérique afin de mesurer la fluorescence, reflétant la perméabilité intestinale. Nous avons ensuite sacrifié les souris et prélevé différents segments de l'intestin afin d'évaluer la gravité de la maladie.

La figure 32 représente les différents paramètres mesurés. Nous avons bien induit une colite comme le montre les souris contrôles DSS qui ont un score qui augmente par rapport aux souris n'ayant pas reçu de DSS (Figure 32A, B, C et D). Nous n'avons pas observé de différence sur la courbe de poids en fonction du traitement aux AHLs pour les souris traitées au DSS. En revanche, il y a une diminution du score global d'activité de la colite en présence d'ACP, dû à une diminution du score de la diarrhée comme observé sur la figure 32C. Cet effet n'est pas

observé pour la 3-oxo-C12:2-HSL. Nous n'avons pas constaté de différences entre les groupes DSS en ce qui concerne la longueur du côlon (Figure 32E) et la perméabilité intestinale (Figure 32F). En revanche, en présence d'ACP, nous avons observé une tendance ($p= 0.17$) vers la diminution du taux de lipocaline-2 et de calprotectine dosées dans le contenu colique, avec des réponses très hétérogènes entre les souris (Figure 32G et H)

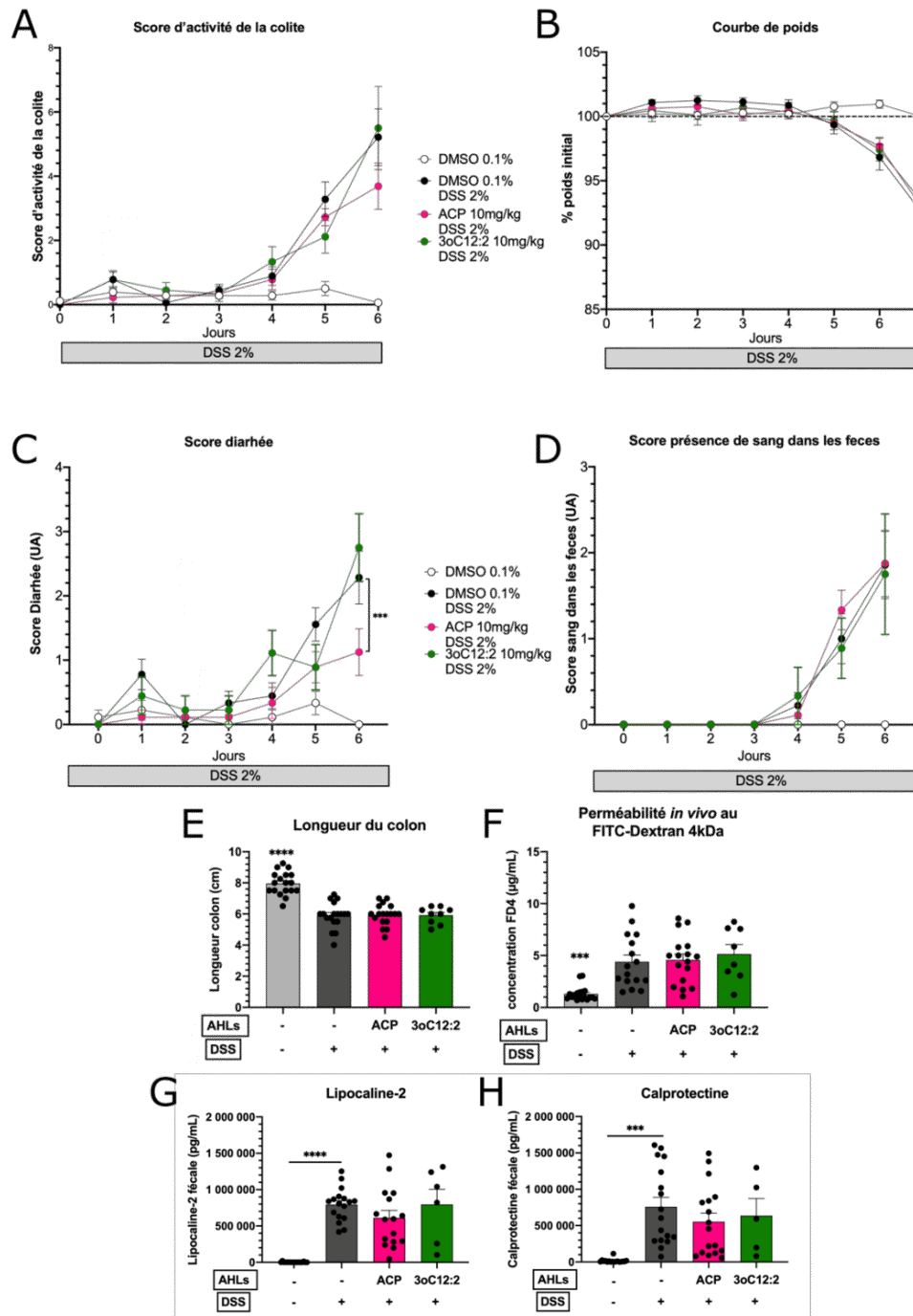


Figure 32 : Effets de l'ACP et de la 3-oxo-C12:2-HSL sur la colite inflammatoire de souris

Deux expériences ont été réalisées avec 9 souris par groupe, réparties en 3 cages. Le groupe 3-oxo-C12:2-HSL n'était présent que dans un groupe. Un groupe n'est pas présenté dans les figures, les souris ayant reçu de l'ACP mais pas de DSS, car nous n'avons pas observé de différence par rapport au contrôle DMSO. Les souris ont reçu quotidiennement par gavage intra-gastrique l'une ou l'autre des AHLs (3-oxo-C12:2-HSL ou ACP à 10mg/kg), ou du DMSO à 0,1% pour le contrôle. En parallèle, les souris ont reçu du DSS 2% dans leur eau de boisson, afin d'induire une colite inflammatoire modérée. Tous les jours, le score de la maladie (A) a été évalué, en fonction du poids (B), de la consistance des fèces (C) et de la présence de sang dans les fèces (D). Au bout de 7 jours, la perméabilité intestinale a été évaluée grâce à un traceur fluorescent, le FITC-Dextran 4 kDa (FD4, Sigma) (F), la longueur du côlon a été mesurée (E) et la lipocaline-2 et la calprotectine du contenu du côlon ont été dosés par ELISA (G et H). Données issues de deux expériences indépendantes constituées chacune de 9 souris par groupes (sauf condition 3-oxo-C12:2-HSL, 1 expérience avec une souris) Moyenne \pm SEM C : unpaired T-test ; E et F : One-Way ANOVA Dunnett's post test ; G et H : Kruskal-Wallis Dunn's post-test. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs. Contrôle ou vs. la condition indiquée.

Par ailleurs, nous avons dosé différentes cytokines dans un lysat de côlon total (Figure 33). De façon surprenante, il n'y a pas de différence de taux de cytokines pro-inflammatoires entre les souris contrôles négatifs (sans DSS et sans AHL) par rapport aux souris contrôles positifs (avec DSS et sans AHLs), hormis pour la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β (Figure 33A). L'IL-6 diminue de façon significative et le TNF α a tendance à diminuer également lorsque les souris reçoivent de l'ACP (Figure 33D). Les diminutions sont plus marquées et significatives pour l'IL-6 et le TNF α en présence de 3-oxo-C12:2-HSL (Figure 33B et D). L'IL-10 a également tendance à diminuer en présence de l'une ou l'autre des AHLs (Figure 33C).

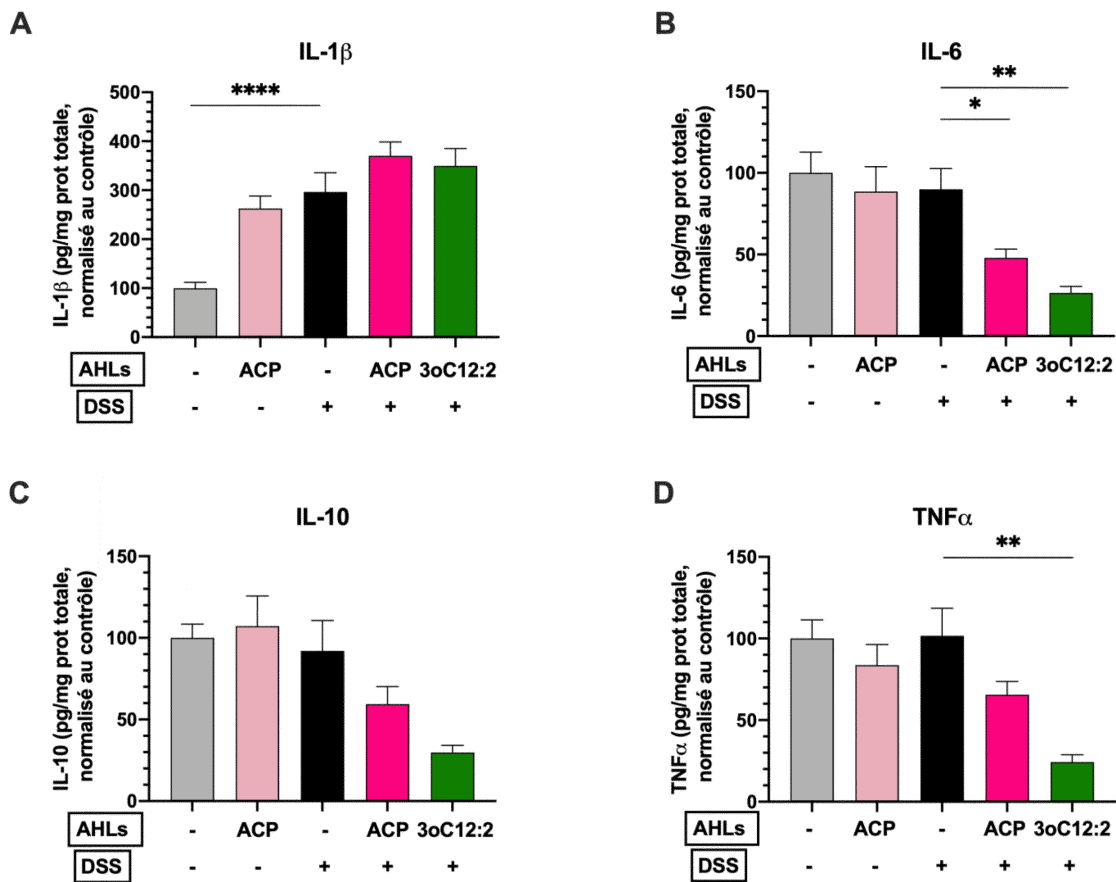


Figure 33 : Taux de cytokine dans le côlon de souris traitées au DSS et aux AHLs

A la fin de l'expérience décrite dans la figure 32, le côlon total des souris a été lysé et les cytokines ont été dosées par ELISA (Duoset, Biotechne). Les concentrations des cytokines ont été normalisées aux protéines totales ainsi qu'au contrôle (sans DSS et sans AHL). Les données sont issues de deux expériences indépendantes constituées chacune de 9 souris par groupes., sauf le groupe 3-oxo-C12:2-HSL, présent dans une seule expérience. A, B, C, D : Moyenne \pm SEM One-Way ANOVA Tukey's post-test * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs condition indiquée.

L'ADN ribosomique 16S des fèces des souris de ces expériences a été extrait et séquencé. Cela nous a permis d'analyser la composition du microbiote bactérien et d'évaluer l'influence de l'apport de l'ACP (Figure 34). L'analyse de la diversité alpha et beta ne souligne aucune

tendance de variation entre les groupes expérimentaux, dans nos conditions (Figure 34A et B). En revanche, la diversité bêta démontre que deux clusters sont formés, les souris 7 jours après avoir reçu du DSS et les souris n'ayant pas reçu de DSS (Figure 34B). Le traitement pendant 7 jours au DSS a donc bien eu un impact sur la composition bactérienne du microbiote. Aucune tendance franche n'est observable dans la variation des phyla entre les trois groupes de traitement (Figure 26C).

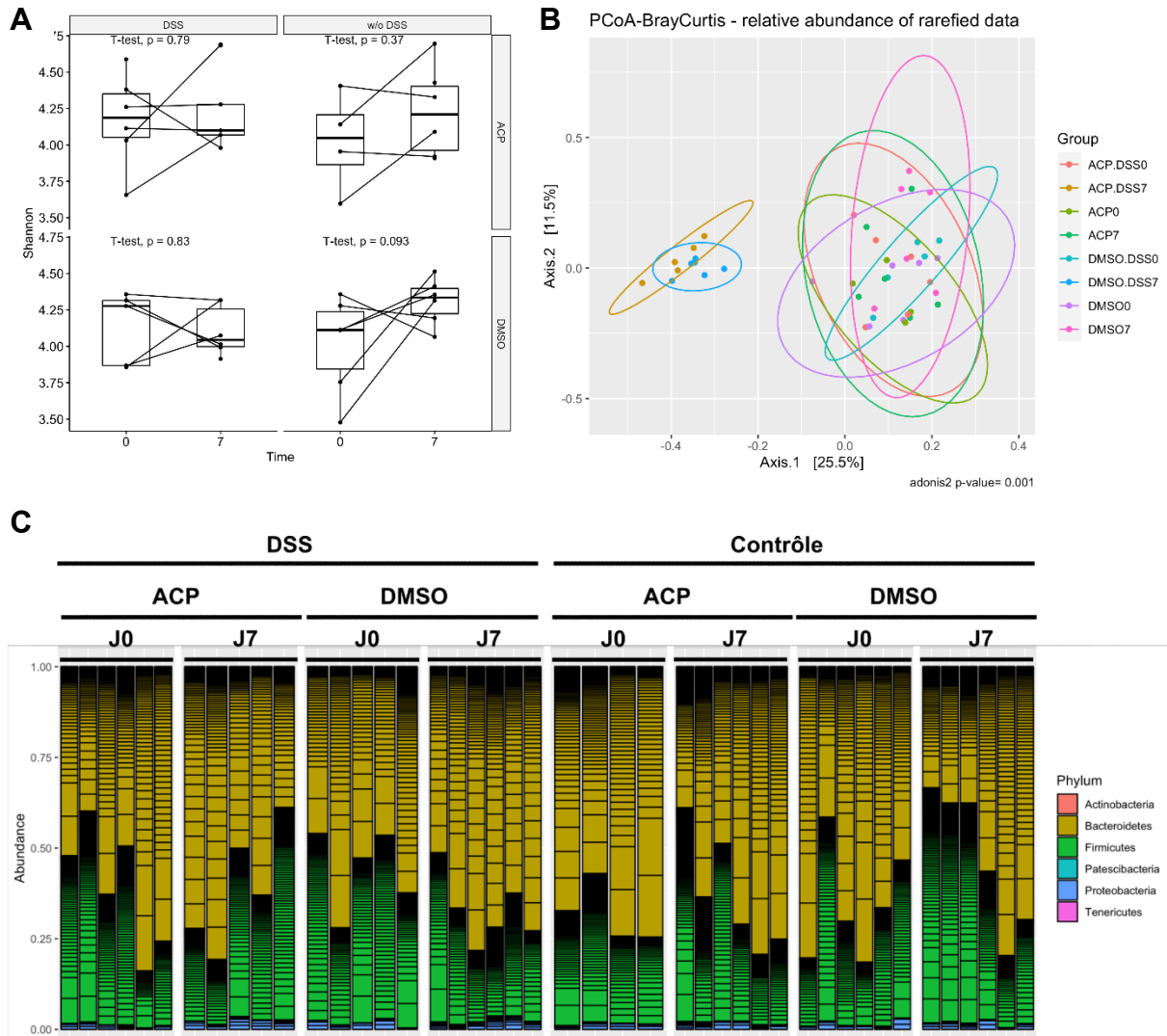


Figure 34: Impact de l'ACP sur la composition du microbiote bactérien

Les souris ont été gavées en intra gastrique quotidiennement à l'ACP avec 10mg/kg ou au DMSO comme contrôle. Les fèces ont été récoltés au jour initial (J0) et après 7 jours de gavage (J7). L'ADN des fèces a été extrait et l'ADN ribosomique 16S a été séquencé puis analysé. **A** : Diversité alpha sur la diversité en OTU du microbiote fécal pour une expérience. Résultats exprimés sous forme de boîte à moustache représentant la médiane et les quartiles des données. Les moustaches représentent 1,5 fois l'écart interquartile. (n=4 ou par condition, t-test) ; **B** : Diversité beta : analyse en composantes principales basée sur la matrice de distance de Bray-Curtis, permettant de discriminer 2 groupes : les souris ayant reçu du DSS et les souris qui n'en ont pas eu ; **C** : Taxonomie des phyla des trois expériences à J0 et J7. Les figures sont représentatives de trois expériences menées indépendamment. Les séquences de l'ADN ribosomique 16S ont été analysées avec le logiciel QIIME2 avec le pipeline DADA2. Puis, les séquences ont été alignées avec les séquences de la base de données SILVA avec le logiciel R et les packages Phyloseq et metagenomeSeq, R a été également utilisé pour faire les figures

L'ensemble de ces résultats sont encourageants et suggèrent qu'un effet anti-inflammatoire de la part de la molécule naturelle 3-oxo-C12:2-HSL et de la molécule synthétique ACP dans ce modèle murin.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I- Les AHLs, point de vue original dans le paradigme du Quorum Sensing

L'intestin est un des écosystèmes les plus densément peuplés. La concentration bactérienne est de près de 10^{11} bactéries par millilitre de contenu de côlon (Sender *et al.*, 2016). Aussi semble-t-il cohérent d'étudier les **systèmes de communication inter-bactériens** au sein de cet environnement, et leur impact sur l'hôte. Fréquemment étudié d'un point de vue de la pathologie et de la virulence des agents infectieux (Amara *et al.*, 2011; Reen *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2002b), une perspective différente émerge dans l'étude du Quorum Sensing (QS). Karina Bivar Xavier et son équipe ont publié plusieurs articles démontrant de l'impact bénéfique pour l'hôte de AI-2, la molécule du QS dite « universelle » au sein du microbiome. La colonisation du microbiote intestinal de souris dysbiotiques par des bactéries *E. coli* modifiées pour synthétiser AI-2 permet d'augmenter la proportion de Firmicutes et influence l'équilibre compositionnel du microbiote (Thompson *et al.*, 2015). AI-2 est une molécule permettant de créer de larges réseaux entre bactéries à Gram négatif et positif (Mukherjee and Bassler, 2019b).

Notre équipe s'est intéressée à une autre catégorie de molécule signal : AI-1, représentée par les AHLs. Pour la première fois, notre équipe a décrit la présence d'AHLs dans l'intestin en situation physiologique et a montré que ces AHLs étaient diminuées chez les patients atteints de MICI, en particulier en période de poussée (Landman *et al.*, 2018). La 3-oxo-C12:2-HSL est dominante dans l'écosystème intestinal humain, et l'objectif a donc été d'explorer les effets de cette molécule sur l'hôte, en conditions pro-inflammatoires. Une première étude a démontré que cette AHL permettait, *in vitro*, de protéger la fonction de barrière intestinale contre les effets délétères des cytokines pro-inflammatoires (Aguanno *et al.*, 2020). En effet, la 3-oxo-C12:2-HSL atténue la désorganisation des jonctions serrées, notamment en diminuant l'ubiquitination et l'internalisation des protéines induites par les cytokines interféron- γ et TNF α .

Au cours de ma thèse, nous avons également mis en évidence les effets anti-inflammatoires de la 3-oxo-C12:2-HSL sur un modèle de lignée de macrophages murins RAW264.7 mais aussi sur un modèle plus physiologique de cellules immunitaires mononuclées issues du sang périphérique (**PBMC**). Ces effets passaient en partie par la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que **TNF α** et **l'IL-1 β** . Étonnamment, l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, était également diminuée en présence de l'AHL. Nous avons également mis en évidence une diminution de certaines protéines pro-inflammatoires (IL-6 et **TNF α**) dans le côlon de souris exposées au DSS et à la 3-oxo-C12:2-HSL par rapport aux souris traitées au

DSS seul. D'autre part, en analysant le transcriptome des macrophages exposés à l'AHL en condition inflammatoire, nous avons observé l'implication des voies NF- κ B et JAK-STAT dans la signalisation de la 3-oxo-C12:2-HSL.

Au cours de ces travaux, nous avons eu à déterminer les doses des AHLs utilisées dans les différents types d'expériences sans connaître les doses auxquelles les cellules intestinales sont exposées à l'état physiologique. Pour les modèles de cellules en culture, les concentrations employées dans ce travail sont cohérentes avec celles utilisées dans la littérature, 50 μ M pour les expériences sur l'inflammation (Glucksam-Galnoy *et al.*, 2013), 150 μ M pour celles menées sur la perméabilité (Aguanno *et al.*, 2020; Vikstrom *et al.*, 2006), mais nous avons également observé des effets sur les jonctions à des doses employées pour les effets anti-inflammatoires (Thèse de Doriane Aguanno). *In vivo*, une étude menée sur l'intestin de petits animaux a utilisé une dose de 20mg/kg d'AHL en intra-péritonéal (Cheng *et al.*, 2021), tandis que nous avons gavé les souris avec 10mg/kg d'AHLs, ce qui est un ordre de grandeur courant. Il est difficile d'estimer les concentrations locales en AHLs chez l'homme. Chez des patients ayant la mucoviscidose et infectés par *P. aeruginosa*, des concentrations de 1 à 20nM en 3-oxo-C12-HSL ont été mesurées dans leur expectorations (Erickson *et al.*, 2002b). Par ailleurs, dans des biofilms *in vitro*, des concentrations allant jusqu'à 600 μ M ont été détectées, tandis qu'à l'état planctonique les bactéries ne synthétisent que quelques micromolaires d'AHL (Charlton *et al.*, 2000). Concernant la 3-oxo-C12:2-HSL, il en a été détecté environ 2,6 nmol par gramme de fèces humain (Landman *et al.*, 2018). Dans nos expériences *in vivo*, nous avons détecté environ 2,5 μ mol de 3-oxo-C12:2-HSL par gramme fèces de souris qui ont reçu de la molécule, soit un facteur mille par rapport à ce qui a été détecté dans les fèces humains. L'estimation des concentrations physiologiquement pertinentes est très compliquée au vu du fonctionnement du système du QS. Ce sont des molécules sécrétées localement et dont les concentrations locales peuvent être très élevées (comme c'est le cas dans les biofilms par exemple) tandis que la concentration générale à l'échelle du microbiote sera plus faible.

Au-delà des doses d'AHLs utilisées, les modèles cellulaires utilisés dans ce travail sont aussi à considérer pour discuter des résultats. Le modèle des RAW264.7, lignée cellulaire de monocytes principalement utilisée dans ce travail, activés par une combinaison de lipopolysaccharide (LPS) et d'interféron- γ (IFN γ), a été établi par des travaux précédents au laboratoire (Thèse d'Agathe Peyrottes, 2020). Le LPS et l'IFN γ sont classiquement utilisés pour

mimer un contexte inflammatoire dans des lignées de cellules immunitaires et oriente les macrophages vers une **polarisation pro-inflammatoire** (Isidro and Appleyard). Classiquement, les macrophages étaient classés en deux catégories, M1 et M2, avec respectivement une activation classique pro-inflammatoire et une activation alternative anti-inflammatoire. Cette nomenclature est remise en question, et il est possible de discriminer de multiples sous-populations de macrophages en fonction de leurs phénotypes et leur fonctions, et de l'état physiopathologique (Moreira Lopes *et al.*, 2020). Lors d'une poussée inflammatoire chez les patients MICI, il y a un afflux de macrophages dérivés des monocytes circulants, qui présentent un profil pro-inflammatoire avec une activation classique (Isidro and Appleyard). *A contrario*, les macrophages résiduels, dits « macrophages régulateurs », permettent la résolution de l'inflammation en sécrétant la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et induisant un retour à une période de rémission (Moreira Lopes *et al.*, 2020). Cependant, lors des MICI, cette sous-population est largement diminuée et il y a un déséquilibre des populations de macrophages (Moreira Lopes *et al.*, 2020; Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). Les macrophages activés par l'IFN γ et du LPS activent la voie **JAK-STAT**, en utilisant en particulier **STAT1** (Darnell *et al.*, 1994; Held *et al.*, 1999; Orecchioni *et al.*, 2019), mais aussi la voie **NF- κ B** via le *Toll Like Receptor-4 (TLR4)* (Held *et al.*, 1999; Viola *et al.*, 2019) et AP-1 (Viola *et al.*, 2019). En présence de 3-oxo-C12:2-HSL, nous avons observé, dans les macrophages murins RAW264.7, une diminution de l'activation de **STAT1** ainsi qu'une diminution de l'activation de **JAK1**, traduisant une diminution de la réponse inflammatoire provoquée par le LPS et l'IFN γ . De plus, la phosphorylation du facteur de transcription **RelA** de la voie NF- κ B était également diminuée en présence de l'AHL. Ces observations sont en accord avec l'induction d'une réponse inflammatoire dans notre modèle et démontrent de la capacité de la 3-oxo-C12:2-HSL à atténuer l'activation pro-inflammatoire des macrophages. Plus encore, étant donné que les patients MICI présentent une augmentation des macrophages types M1 (Moreira Lopes *et al.*, 2020), l'absence de la 3-oxo-C12:2-HSL dans l'écosystème intestinal chez ces patients est cohérent (Landman *et al.* 2018).

L'utilisation en première intention d'une lignée de macrophages murins est un bon modèle pour pouvoir transposer les résultats *in vitro* aux résultats *in vivo* chez la souris. Cependant, l'utilisation des lignées cellulaires a des limites. Nous avons donc, par la suite, testé les effets des molécules d'intérêt sur des cellules mononucléées issues du sang périphérique (**PBMC**) afin d'avoir un modèle humain plus physiologique. Nous avons observé une forte diminution

de la sécrétion de TNF α en présence de 3-oxo-C12:2-HSL (de l'ordre de 80%), démontrant un fort effet anti-inflammatoire, qui augmentait avec la dose de l'AHL.

Au-delà de l'étude des AHLs naturelles dans l'intestin, il est également intéressant d'exploiter ces effets anti-inflammatoires afin de développer de potentiels **composés thérapeutiques**. Ce travail de thèse a donc démontré la possibilité de développer des AHLs analogues telles que l'ACP (Peyrottes *et al.*, 2020). Cette molécule exerce des effets anti-inflammatoires plus puissant que la 3-oxo-C12:2-HSL sur l'inflammation des cellules immunitaires *in vitro*, notamment sur les PBMC, renforçant notre intérêt pour ces molécules. De plus, l'ACP n'active pas le récepteur bactérien aux AHLs LasR (Peyrottes *et al.*, 2020). Étant donné que le QS est lié à la virulence de bactéries pathogènes, il paraît intéressant d'avoir une AHL qui conserve les effets anti-inflammatoires sur l'hôte, mais qui n'active pas les récepteurs bactériens. Nous pouvons donc poser l'hypothèse que les effets observés *in vivo* par l'ACP ne s'exercent pas *via* une modulation du microbiote mais directement sur l'hôte.

L'influence du microbiome et de ses métabolites sur la physiologie de l'hôte suscitent un intérêt croissant et des nombreuses corrélations sont faites avec une multitude de pathologies (Dickerson *et al.*, 2017; Maruvada *et al.*, 2017; Vogt *et al.*, 2017). De multiples traitements pour favoriser le « retour à l'équilibre du microbiote » sont développés et attisent la curiosité du grand public ... Des études scientifiques ont démontré les effets bénéfiques de certains probiotiques tels que *Bifidobacterium longum* : un effet anti-inflammatoire, une amélioration de la fonction de barrière intestinale et également la capacité à moduler la composition du microbiote (Abraham and Quigley, 2017). L'Association Scientifique Internationale pour les Probiotiques et les Prébiotiques (ISAPP) définit plusieurs catégories (Salminen *et al.*, 2021). Les **probiotiques** sont des « micro-organismes vivants qui, administrés en quantité adéquates, confèrent un bénéfice sur la santé de l'hôte ». Les **prébiotiques** « stimulent la croissance des micro-organismes et confèrent ainsi un bénéfice santé sur l'hôte ». La troisième catégorie, les **postbiotiques**, a été défini relativement récemment et est considérée comme « une préparation de micro-organismes inanimés et/ou de leurs particules restantes qui confère un avantage pour la santé de l'hôte ». Les AHLs, naturelles ou synthétiques, ne peuvent être qualifiées par de tels termes, l'ISAPP recommande plutôt de dénommer les métabolites purifiés par leur propre nomenclature chimique. Au-delà de ces questions de nomenclatures, le développement de molécules telles que l'ACP, ayant des effets anti-inflammatoires, mais n'activant pas les récepteurs bactériens LasR (Peyrottes *et al.*, 2020) serait un atout majeur dans le cadre des maladies inflammatoires.

Plusieurs stratégies peuvent être envisagées dans la conception d'analogues d'AHLs : (i) Les AHLs étant des molécules du dialogue bactérien, il est possible d'imaginer des AHLs permettant la croissance de bactéries bénéfiques pour l'hôte et diminuées lors de dysbiose de MICI, telles que *F. prausnitzii* (Sokol *et al.*, 2008, 2009). Les AHLs auront donc un effet indirect sur l'hôte ; (ii) Des AHLs n'activant pas les récepteurs bactériens mais ayant des effets anti-inflammatoires directement sur les cellules de l'hôte, comme c'est le cas de l'ACP ; (iii) des AHLs agissant à la fois sur les populations bactériennes, pour un retour à une normobiose, et à la fois directement sur l'hôte.

II- Récepteurs et mécanismes d'action inter-règne des AHLs

La caractérisation et la compréhension des mécanismes qui expliquent les effets des AHLs naturelles, dont la 3-oxo-C12:2-HSL sur l'hôte est une question qui se pose également. Notre équipe a pour la première fois mis en évidence la présence d'AHLs dans l'écosystème intestinal humain, dont la 3-oxo-C12:2-HSL, qui n'avait jusqu'alors jamais été décrite (Ladman *et al.*, 2018). La structure de cette AHL est très proche de la 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa*, nous avons donc émis des hypothèses sur les effets de la 3-oxo-C12:2-HSL par analogie avec la 3-oxo-C12-HSL.

Malgré les nombreuses publications rapportant des effets inter-règnes de la 3-oxo-C12-HSL de *Pseudomonas* sur l'inflammation des cellules de l'hôte, les mécanismes cellulaires impliqués restent encore mal compris. L'implication de la voie **NF-κB** a été démontrée pour les effets sur la modulation de l'inflammation de macrophages humains (Kravchenko *et al.*, 2008) et des **MAPK** pour l'activité phagocytaire des macrophages et le chimiotactisme des neutrophiles (Kahle *et al.*, 2013; Kravchenko *et al.*, 2006; Vikström *et al.*, 2005) mais aucun consensus n'a vraiment été établi. Cependant, les effets de la 3-oxo-C12-HSL, comme développé dans l'Introduction, dépendent très fortement du type cellulaire étudié et de la dose employée.

Afin d'identifier de potentiels voies impliqués dans la réponse cellulaire aux AHLs, nous avons séquencé le **transcriptome** des RAW264.7 exposés à la 3-oxo-C12:2-HSL ou à l'ACP en conditions pro-inflammatoires. Cela nous a permis de mettre en évidence dans les macrophages, en présence de l'une ou l'autre des AHLs, que l'expression des gènes liés à la voie **JAK-STAT** était diminuée et qu'en présence de 3-oxo-C12:2-HSL, c'était également le cas pour la voie **NF-κB**. De façon intéressante, le nombre de voies différentiellement régulées par la 3-oxo-C12:2-HSL (64 voies) était considérablement plus élevé que celles régulées par

l'ACP (8 voies). Il est possible que la **cinétique** d'action des deux molécules soit différente et que nous n'observions pas autant d'effet au même temps d'exposition. Il est envisageable que certains gènes et voies n'aient pas été identifiés par transcriptome mais que des cascades de phosphorylation sont impliquées et une plus ample exploration est nécessaire.

L'identification de la voie JAK-STAT dans la signalisation des AHLs est particulièrement intéressante. En effet, une partie des nouvelles thérapeutiques actuelles ciblent spécifiquement les Janus Kinases (JAK) (Yeshi *et al.*, 2020). Les inhibiteurs de JAK sont utilisés depuis presque dix ans dans le cadre de la maladie chronique inflammatoire polyarthrite rhumatoïde (Danese *et al.*, 2019). Des pan-inhibiteurs de JAK, ciblant les trois isoformes, ont été développés en première approche, mais en raison de nombreux effets secondaires dont des infections, des inhibiteurs spécifiques ont été testés (Danese *et al.*, 2019). Une des stratégies thérapeutiques pour les MICI est de cibler des protéines pro-inflammatoires telles que le TNF α à l'aide d'anticorps anti-TNF. Cependant, une telle approche est restreinte à une cytokine, certains patients ne sont pas réceptifs et l'efficacité diminue souvent avec le temps (Danese *et al.*, 2019). L'avantage d'inhiber l'activation des JAK est de pouvoir cibler de multiples cytokines dont l'expression est contrôlée par ces kinase. Cibler JAK1 et JAK3 semble prometteur, tandis que les études menées sur JAK2 ont démontré de nombreux effets secondaires (Danese *et al.*, 2019). De plus, l'objectif est de développer des molécules qui seraient spécifiques à l'intestin afin de diminuer les effets secondaires (Hernandez-Rocha and Vande Casteele, 2020). Le Tofacitinib est le seul anti-JAK approuvé comme thérapie contre la RCH et plusieurs essais cliniques sont en cours pour évaluer le bénéfice de ces anti-JAK pour les MICI (Hernandez-Rocha and Vande Casteele, 2020).

Par ailleurs, les récepteurs eucaryotes aux AHLs restent à identifier. Parmi les récepteurs de la 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa*, le récepteur du gout amer T2R38 est celui qui a le plus été étudié ((Gaida *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2012; Maurer *et al.*, 2015). De nombreux articles font le lien entre polymorphisme du gène codant pour **T2R38**, et susceptibilité à l'infection à *P. aeruginosa* (Maurer *et al.*, 2015; Turnbull *et al.*, 2018; Verbeurgt *et al.*, 2017). Au vu des conformations proches de la 3-oxo-C12-HSL et la 3-oxo-C12:2-HSL, nous nous sommes demandés si cette dernière interagissait aussi avec T2R38. Par une approche ciblée, nous nous sommes intéressés aux **récepteurs du goût amer** (BTR pour *Bitter Taste Receptors*) qui suscitent un intérêt croissant, au-delà de l'alimentation, et leur implication dans l'immunité, la contraction musculaire, le tractus uro-génital... (Lu *et al.*, 2017). En première approche, sur le modèle des cellules RAW264.7, nous avons démontré que lorsque T2R38 était inhibé, nous

n'observons plus de réponse anti-inflammatoire en présence de la 3-oxo-C12:2-HSL. Ces résultats nous ont amenés à collaborer avec Loïc Briand (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRAE de Dijon), afin de faire un *screening* large pour identifier les récepteurs du goût amer humains activés par la 3-oxo-C12:2-HSL et l'ACP. Nous avons identifié six récepteurs activés par la 3-oxo-C12:2-HSL, dont certains sont qualifiés d'«orphelins», c'est-à-dire sans ligand connu.

La cascade de signalisation des BTR aboutit au relargage du **calcium** par le **réticulum endoplasmique**, via l'activation des **récepteurs à l'inositol triphosphate** (Jeruzal-Swiątecka *et al.*, 2020). Nous avons démontré que la 3-oxo-C12:2-HSL induisait une augmentation des flux calciques intra-cellulaires, ce qui appuie l'hypothèse d'une interaction entre BTR et 3-oxo-C12:2-HSL.

Le lien entre inflammation et récepteurs du goût amer a été abordé par plusieurs publications et Menizibeya Welcome a effectué une recherche extensive de la bibliographie pour établir un **lien entre BTR et inflammation** dans le tractus uro-génital (Welcome, 2020). Un article décrit des effets anti-inflammatoires induits par plusieurs agonistes de récepteurs du goût amer, en diminuant la sécrétion des protéines pro-inflammatoires TNF α , IL-8 et CCL3 par des macrophages pulmonaires (Grassin-Delyle *et al.*, 2019). De plus, des souris invalidées pour le gène codant la **Gustducine**, une protéine impliquée dans la transduction du signal des récepteurs du goût amer, sont plus sensibles à une colite induite par du DSS (Feng *et al.*, 2018b). Ces résultats similaires ont été obtenus avec les récepteurs du goût sucré (Zhou *et al.*, 2018).

De façon surprenante, l'ACP n'a activé aucun des récepteurs testés. Bien que cette molécule partage la même chaîne aliphatique que la 3-oxo-C12-HSL, le noyau lactone est substitué par un cycle phénol ; nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le cycle lactone est nécessaire à l'interaction avec les récepteurs du goût amer.

A côté de l'identification des récepteurs du goût amer comme récepteurs membranaires putatifs, les AHLs étant capables de rentrer passivement dans la cellule au vu de leur structure chimique (Thèse d'Agathe Peyrottes, 2019), il ne faut pas exclure la possibilité de l'existence de récepteurs intra-cellulaires. Plusieurs équipes ont suggéré l'interaction de la 3-oxo-C12-HSL et de PPAR γ (Bedi *et al.*, 2017; Cooley *et al.*, 2010; Jahoor *et al.*, 2008). PPAR γ est un récepteur nucléaire qui est un facteur de transcription permettant de réprimer ou activer l'expression de certains gènes, dont ceux impliqués dans l'inflammation (Ning *et al.*, 2019). **PPAR γ** réprime en particulier la voie NF- κ B et est capable de réguler la réponse immunitaire innée et adaptative

(Pascual *et al.*, 2005). Ce récepteur nucléaire est fortement exprimé dans le côlon (Roudsari, 2020). Il a été montré dans plusieurs études que l'expression de PPAR γ était diminuée chez les patients touchés par la RCH (Ning *et al.*, 2019). De façon intéressante, la signalisation du 5-ASA (acide 5-aminosalicylique), anti-inflammatoire largement utilisé en thérapeutique dans le cadre des MICI (Yeshi *et al.*, 2020), dépend de l'activité de PPAR γ (Rousseaux *et al.*, 2005). Étant donné que nous avons observé une diminution de la voie NF- κ B en présence de la 3-oxo-C12:2-HSL, nous pouvons poser l'hypothèse de l'implication de PPAR γ dans la signalisation de cette AHL.

Approfondir l'étude des récepteurs des AHLs permettrait d'envisager une approche structure-fonction, pour synthétiser des analogues aux AHLs plus affins aux récepteurs cibles. Pouvoir identifier de nouveaux récepteurs implique de surmonter des difficultés techniques. D'une part, cela nécessiterait la synthèse d'AHLs biotinylées, pour trouver des interactants par co-immunoprécipitation par exemple. De même, il serait un avantage d'avoir des AHLs couplées à des fluorochromes, afin de pouvoir, en imagerie, identifier les compartiments cellulaires dans lesquels les AHLs s'accumulent. Pour répondre à cette question, il serait également possible de faire des fractionnements cellulaires et d'analyser par spectrométrie de masse la présence des AHLs.

Nous avons par ailleurs observé que la 3-oxo-C12:2-HSL protégeait contre la **désorganisation des jonctions serrées** induite par les cytokines pro-inflammatoires (Aguanno *et al.*, 2020). La perturbation de la barrière intestinale est une caractéristique des patients MICI (Odenwald and Turner, 2016), notamment dû au contexte pro-inflammatoire et au TNF α (Su *et al.*, 2013). Le mécanisme par lequel la 3-oxo-C12:2-HSL protège les protéines des jonctions serrées contre l'ubiquitination et l'endocytose demeure indéterminé. Identifier les cibles eucaryotes de cette AHLs permettrait de mettre en lien les effets sur la fonction de barrière et sur l'inflammation. Il a été rapporté que la 3-oxo-C12-HSL interagit avec la protéine IQGAP1 (Karlsson *et al.*, 2012b). IQGAP1 est une protéine d'échafaudage qui intervient dans de nombreux processus cellulaires. Elle interagit notamment avec la E-cadhérine, mais il est aussi possible que IQGAP1 participe au recrutement des claudines 2 et 4 au niveau des jonctions serrées (Tanos *et al.*, 2018). Étant donné les effets de la 3-oxo-C12:2-HSL que nous avons observées sur les jonctions serrées, il semble naturel d'explorer les interactions éventuelles entre cette AHL intestinal et IQGAP1.

De façon intéressante, Vikström et son équipe ont suggéré que la 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa* induisait la désorganisation des jonctions serrées via la mobilisation du calcium du réticulum endoplasmique (Vikström *et al.*, 2010). Ces observations sont à rapprocher de nos résultats sur la 3-oxo-C12:2-HSL, d'une part la modulation des flux calciques dans les macrophages RAW264.7 et d'autre part une protection des jonctions serrées dans les cellules épithéliales Caco-2/TC7 (Aguanno *et al.*, 2020). On peut ainsi proposer que ces deux AHLs dont les structures chimiques ne diffèrent que par une double insaturation, partagent des voies de signalisation communes, mais avec des effets opposés sur l'organisation des jonctions intercellulaires.

La modulation des flux calciques est liée au **stress du réticulum endoplasmique (RE)**. Lors d'un déséquilibre des concentrations en calcium, à l'intérieur ou à l'extérieur du RE, le stress du RE est activé, en particulier l'**UPR (Unfold Protein Response)** (Krebs *et al.*, 2015). L'UPR induit, entre autres, l'activation de la voie **NF-κB** (Deng *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006) mais aussi l'expression de cytokines (Coleman and Haller, 2019). L'UPR peut également jouer sur la fonction de barrière, en augmentant notamment l'apoptose des cellules épithéliales intestinales, en diminuant l'autorenouveau des cellules souches intestinales mais aussi en diminuant la capacité des cellules de Paneth à synthétiser des peptides anti-microbiens (Coleman and Haller, 2019). Réciproquement, l'inflammation peut déclencher l'activation du stress du RE (Krebs *et al.*, 2015). Par ailleurs, la 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa* induit le stress du réticulum (Shiner *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2014).

Collectivement, ces résultats démontrent de la nécessité d'étudier l'homéostasie du RE en présence de 3-oxo-C12:2-HSL. De surcroît, le stress du RE est impliqué dans la physiopathologie des MICI, de nombreuses études démontrent que les souris invalidées pour les gènes codant des protéines de l'UPR sont plus sensibles à une colite inflammatoire (Coleman and Haller, 2019).

III- Dialogues sociaux dans l'intestin : conversation entre le microbiote et l'hôte

L'étude des interactions entre le microbiote, ses métabolites et l'hôte, dans un environnement aussi complexe que l'intestin, nécessite inévitablement le passage à des expériences *in vivo*.

Nos expériences chez la souris ne nous ont pas permis de mettre en évidence une influence claire de la 3-oxo-C12:2-HSL ou de l'ACP sur une colite inflammatoire. Nous avons néanmoins

observé une diminution de cytokines pro-inflammatoires dans le côlon (IL-6 et TNF α). Les cytokines ont été dosées sur un lysat total de côlon et il serait plus judicieux par la suite d'isoler la muqueuse et de faire un dosage sur ce compartiment, afin d'avoir une mesure plus fine.

L'ACP a par ailleurs exercé un effet bénéfique sur la diarrhée des souris affectées par une colite inflammatoire. La consistance des fèces est liée aux flux ioniques et hydriques au niveau de l'épithélium intestinal. La **claudine-2** forme un canal paracellulaire permettant le passage sélectifs des cations (Luettig *et al.*, 2015). Il est connu que l'expression de la claudine-2 est augmentée dans la muqueuse de patients MC et que les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IFN γ induisent une augmentation de l'expression de cette protéine *in vitro* (Amasheh *et al.*, 2009; Luettig *et al.*, 2015). Il serait intéressant de mesurer l'expression de la claudine-2 dans le côlon et l'iléon des souris exposées à l'ACP. De plus, nous pourrions approfondir les effets de l'ACP sur les flux ioniques dans le modèle de monocouche de cellules épithéliales Caco-2/TC7 cultivées sur transwell et traitées avec de l'EGTA, un chélateur du calcium connu pour augmenter les flux ioniques (Artursson, 1990; Boulenc *et al.*, 1993).

Dans nos conditions expérimentales, les AHLs n'ont pas eu d'impact sur la courbe de poids, la longueur du côlon ou la perméabilité intestinale aux macromolécules. Le modèle employé est un modèle de colite aiguë, mais il est également envisageable d'induire une colite chronique avec du DSS, qui reflèterait l'alternance de périodes de poussées et de rémission qui caractérisent les MICI. Dans ce modèle, le DSS serait administré à faible dose pendant une semaine en alternance avec une période de rémission de deux semaines, pour une durée de trois cycles (Wirtz *et al.*, 2017). Ce modèle est plus long à mettre en place mais reflèterait mieux les changements immunologiques observés lors de MICI.

Concernant le microbiote fécal dans ces modèles murins, nous n'avons pas observé d'effet de la 3-oxo-C12:2-HSL ou de l'ACP sur la composition du microbiote à l'état basal. Il est néanmoins possible que les effets des AHLs ne soient pas visibles sur la composition du microbiote mais se traduisent par des modifications fonctionnelles sur certains métabolites bactériens. Ainsi, il serait intéressant d'analyser le profil d'autres métabolites bactériens régulant et ou participant à l'inflammation tels que des acides biliaires ou des acides gras à chaîne courte par spectrométrie de masse par exemple, ce qui est une compétence bien maîtrisée par notre laboratoire. Par ailleurs, nous ne nous attendons pas nécessairement à ce qu'un microbiote de souris saines subisse un changement de sa composition, notamment grâce à la capacité de résilience du microbiote.

Les souris ayant subi une colite DSS dans nos expériences ont un microbiote différent des souris contrôles, ce qui démontre que nous avons bien induit un phénotype de dysbiose. En revanche, nous n'avons pas observé de différences entre les souris DSS ayant reçu l'ACP et les souris DSS contrôle. Etant donné que l'ACP est une molécule qui n'active pas le récepteur bactérien à la 3-oxo-C12-HSL LasR, ces résultats ne sont pas inattendus.

Pour approfondir ces expériences *in vivo*, il serait également intéressant d'analyser par spectrométrie de masse l'impact des AHLs sur le métabolome des souris, à partir du sérum.

L'analyse du microbiote avant l'induction de la colite démontre de la variabilité de la composition bactérienne ce qui est un biais dans nos essais. Nous pourrions utiliser des souris à microbiote contrôlé, telles que le modèle Oligo-MM¹² (Brugiroux *et al.*, 2017). Ces souris, utilisées par une partie de notre équipe en collaboration avec l'Institut Pasteur, possèdent un microbiote intestinal composé de douze souches bactériennes représentatives du microbiote intestinal et qui est stable dans le temps. L'utilisation de ce modèle permettrait de s'affranchir de la variabilité du microbiote de souris achetées dans le commerce.

De plus, un modèle autre que la colite induite par le DSS pourrait être utilisé pour étudier les effets des AHLs sur le microbiote. Par exemple, l'utilisation d'antibiotiques permettrait d'analyser si les AHLs sont capables d'induire un retour à une normobiose.

La voie d'administration des AHLs et la galénique sont également des facteurs à prendre en considération. Wei Cheng et son équipe, lors de leur étude de l'impact des AHLs dans l'intestin, ont injecté la 3-oxo-C12-HSL en intra-péritonéal, à une dose deux fois plus élevée que celle que nous avons utilisée (Cheng *et al.*, 2021). Il est également envisageable d'administrer les AHLs par gélule orale, cela permettrait de contrôler la localisation de la libération des molécules.

Nous n'avons pas réussi à détecter l'ACP dans les fèces des souris ayant reçu cette molécule. Cela est très certainement dû à des problèmes techniques étant donné que l'ACP est une molécule relativement stable (Peyrottes *et al.*, 2020) et il est nécessaire d'optimiser le protocole. En effet, nous avons utilisé la même procédure que pour les AHLs classiques, or l'ACP ne possède pas les mêmes propriétés chimiques, notamment en raison de la présence d'un noyau phénol à la place du noyau lactone.

Notre équipe s'est initialement concentrée sur la caractérisation des effets inter-règnes de l'AHL. Dans un second temps, élucider la question de l'origine de la 3-oxo-C12:2-HSL dans l'intestin permettrait une avancée majeure dans la compréhension de son implication dans la

physiopathologie. Plusieurs équipes ont tenté de déterminer par une approche bio-informatique un système de synthèse bactérien des AHLs dans l'intestin (Erickson *et al.*, 2002a; Kumari *et al.*, 2008; Landman *et al.*, 2018; Swearingen *et al.*, 2013; Won *et al.*, 2020). Parmi les gènes du microbiome qui ont été séquencés et recensés dans les bases de données, aucune piste solide n'a été mise en évidence. Il est également envisageable que la 3-oxo-C12:2-HSL soit le produit d'une chaîne trophique, où des enzymes de l'hôte sont impliquées, notamment pour créer les doubles insaturations.

Par ailleurs, la 3-oxo-C12:2-HSL n'a pas été la seule AHL identifiée dans l'intestin (Landman *et al.*, 2018). La caractérisation de la composition intestinale en auto-inducteurs, sans restreindre aux AHLs, permettrait d'établir des profils métaboliques, au même titre que le sont les acides gras à chaîne courte ou les acides biliaires (Glassner *et al.*, 2020). Il est envisageable de considérer les auto-inducteurs comme des marqueurs d'état d'équilibre du microbiote. Les molécules impliquées dans le QS jouent un rôle déterminant dans la diversité et la composition du microbiote, le profil de ces molécules est donc un reflet de l'état et du changement d'équilibre du microbiote intestinal. Bien évidemment, des avancées considérables sont nécessaires, notamment en spectrométrie de masse, pour mettre au point des protocoles robustes et répétables à grande échelle sur les fèces humaines.

La stratégie expérimentale du laboratoire était d'étudier en premier les effets inter-règnes de la 3-oxo-C12:2-HSL et de l'ACP. Pour cette dernière, nous ne nous attendons pas à des effets importants sur les bactéries, étant donné que l'ACP n'active pas le récepteur LasR de bactéries rapportrices (Peyrottes *et al.*, 2020). Peu d'explorations ont été faites jusqu'à présent sur leurs effets sur les populations bactériennes. L'étude peut être envisagée dans un premier temps sur la croissance et/ou la formation de biofilm de différentes souches individuelles représentatives de l'intestin telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, identifiée comme bactérie bénéfique anti-inflammatoire (Quevrain *et al.*, 2016). Il serait intéressant d'étudier l'impact de la 3-oxo-C12:2-HSL sur des souches pathogènes telles que *E. coli* LF82 adhérent-invasif, qui est augmentée chez les patients MICI. Cela serait d'autant plus pertinent que *E. coli* possède le récepteur homologue à LuxR, qui reconnaît les AHLs et qui est activé par la 3-oxo-C12:2-HSL (Landmann *et al.*, 2018).

Par la suite, un modèle plus complexe pourrait être envisagé telle qu'une co-culture de plusieurs bactéries ou directement des fèces humaines cultivées en fermenteurs. Cela permettrait d'évaluer les effets sur la croissance bactérienne, mais aussi l'impact de nos AHLs d'intérêt sur la dynamique entre populations bactériennes.

D'un point de vue global, l'étude des effets de la 3-oxo-C12:2-HSL sur les micro-organismes du microbiote aiderait à comprendre et à mieux caractériser les effets *in vivo*. Cela permettrait d'intégrer la 3-oxo-C12:2-HSL dans le contexte des MICI dont la physiopathologie associe inflammation, perturbation de la fonction de barrière intestinale et dysbiose.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

En conclusion, au cours de ce travail, nous avons mis en évidence et caractérisé des effets anti-inflammatoires exercés par la 3-oxo-C12:2-HSL. Ces effets sont médiés en partie par la voie NF- κ B et JAK-STAT. De plus, la 3-oxo-C12:2-HSL active plusieurs récepteurs du goût amer, ce qui aboutit au relargage du calcium du réticulum endoplasmique. Les récepteurs du goût amer sont des acteurs suscitant de plus en plus d'intérêt dans le tractus gastro-intestinal et l'interaction avec les métabolites bactériens identifiés dans cette étude en démontre la pertinence. La 3-oxo-C12:2-HSL, AHL nouvellement mis en évidence dans l'écosystème intestinal humain, est l'AHL majoritaire et lors des MICI, sa présence est diminuée lors de la dysbiose. Dans le contexte de la physiopathologie des MICI, il faudrait poursuivre d'une part l'étude de la molécule naturelle 3-oxo-C12:2-HSL pour comprendre son rôle dans la physiologie intestinale. D'autre part, il est envisageable de développer l'étude d'AHLs synthétiques telles que l'ACP afin de développer de nouveaux outils thérapeutiques anti-inflammatoires innovants dans le cadre des maladies inflammatoires. Nous avons démontré des effets anti-inflammatoires puissants de la part de l'ACP, un analogue synthétique des AHLs. Les mécanismes impliqués sont différents de ceux observés pour la 3-oxo-C12:2-HSL, et restent à caractériser.

La multiplicité des acteurs et de leurs échanges dans l'intestin démontre que l'intestin est le siège de plusieurs réseaux sociaux : les cellules de l'hôte communiquent entre elles grâce aux cytokines, aux hormones et à d'autres métabolites, qui ont eux- même un impact sur le microbiome ; tandis que les bactéries dialoguent avec l'hôte à travers les métabolites qu'elles sécrètent. Bien qu'encore peu étudiées dans ce contexte, notre travail montre que les molécules du QS sont des acteurs importants de ce dialogue et poursuivre l'étude du QS, en particulier des AHLs dans l'intestin, permettra de mieux comprendre l'équilibre hôte-microbiote.

La 3-oxo-C12:2-HSL est une molécule qui n'a été que très récemment identifiée et qui ouvre de nombreuses questions sur le Quorum Sensing intestinal, sa place lors des MICI mais aussi son rôle en situation physiologique. Les études menées dans notre équipe laissent entrevoir un intérêt pour ce métabolite bactérien et de nombreux aspects restent encore à exploiter.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abisado, R.G., Benomar, S., Klaus, J.R., Dandekar, A.A., and Chandler, J.R. (2018). Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *9*, 14.
- Abraham, B.P., and Quigley, E.M.M. (2017). Probiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* *46*, 769–782.
- Aguanno, D., Coquant, G., Postal, B.G., Osinski, C., Wieckowski, M., Stockholm, D., Grill, J.-P., Carrière, V., Seksik, P., and Thenet, S. (2020). The intestinal quorum sensing 3-oxo-C12:2 Acyl homoserine lactone limits cytokine-induced tight junction disruption. *Tissue Barriers* 1832877.
- Agus, A., Planchais, J., and Sokol, H. (2018). Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host & Microbe* *23*, 716–724.
- Ahluwalia, B., Magnusson, M.K., and Öhman, L. (2017). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* *52*, 1185–1193.
- Ahmad, R., Sorrell, M.F., Batra, S.K., Dhawan, P., and Singh, A.B. (2017). Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol* *10*, 307–317.
- Al Nabhani, Z., Montcuquet, N., Roy, M., Dussailant, M., Hugot, J.P., and Barreau, F. (2017). Complementary Roles of Nod2 in Hematopoietic and Nonhematopoietic Cells in Preventing Gut Barrier Dysfunction Dependent on MLCK Activity. *Inflammatory Bowel Diseases* *23*, 1109–1119.
- Allaire, J.M., Crowley, S.M., Law, H.T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., and Vallance, B.A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology* *39*, 677–696.
- Allegretti, J., Canavan, J., Mitsialis, V., Hamilton, M., Carrellas, M., Freer, K., Green, J., Gringauz, J., Herwood, N., Hurtado, J., *et al.* (2021). LOW DOSE IL-2 FOR THE TREATMENT OF MODERATE TO SEVERE ULCERATIVE COLITIS. *Gastroenterology* *160*, S9–S10.
- Amara, N., Krom, B.P., Kaufmann, G.F., and Meijler, M.M. (2011). Macromolecular Inhibition of Quorum Sensing: Enzymes, Antibodies, and Beyond. *Chemical Reviews* *111*, 195–208.
- Amasheh, M., Grotjohann, I., Amasheh, S., Fromm, A., Söderholm, J.D., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2009). Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma *in vitro* : A novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* *44*, 1226–1235.
- Ananthakrishnan, A.N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *12*, 205–217.
- Ananthakrishnan, A.N., Bernstein, C.N., Iliopoulos, D., Macpherson, A., Neurath, M.F., Ali, R.A.R., Vavricka, S.R., and Fiocchi, C. (2018). Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *15*, 39–49.
- Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (2009). Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *1*, a002584–a002584.
- Arora, T., and Bäckhed, F. (2016). The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *J Intern Med* *280*, 339–349.

- Artursson, P. (1990). Epithelial Transport Of Drugs In Cell Culture. I: A Model For Studying The Passive Diffusion Of Drugs Over Intestinal Absorbive (Caco-2) Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 79, 476–482.
- Atreya, R., and Siegmund, B. (2021). Location is important: differentiation between ileal and colonic Crohn’s disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 544–558.
- Atreya, I., Atreya, R., and Neurath, M.F. (2008). NF- κ B in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine* 263, 591–596.
- Avau, B., and Depoortere, I. (2016). The bitter truth about bitter taste receptors: beyond sensing bitter in the oral cavity. *Acta Physiologica* 216, 407–420.
- Bain, C.C., and Mowat, A.McI. (2014). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews* 260, 102–117.
- Bain, C.C., and Schridde, A. (2018). Origin, Differentiation, and Function of Intestinal Macrophages. *Front. Immunol.* 9, 2733.
- Bao, L., Yu, J., Zhong, H., Huang, D., and Lu, Q. (2017). Expression of toll-like receptors in T lymphocytes stimulated with *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 125, 553–557.
- Barham, H.P., Taha, M.A., Broyles, S.T., Stevenson, M.M., Zito, B.A., and Hall, C.A. (2021). Association Between Bitter Taste Receptor Phenotype and Clinical Outcomes Among Patients With COVID-19. *JAMA Netw Open* 4, e2111410.
- Barko, P.C., McMichael, M.A., Swanson, K.S., and Williams, D.A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med* 32, 9–25.
- Bassler, B.L., Wright, M., and Silverman, M.R. (1994). Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology* 13, 273–286.
- Bedi, B., Maurice, N.M., Ciavatta, V.T., Lynn, K.S., Yuan, Z., Molina, S.A., Joo, M., Tyor, W.R., Goldberg, J.B., Koval, M., *et al.* (2017). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists attenuate biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *FASEB J.* 31, 3608–3621.
- Bhat, A.A., Uppada, S., Achkar, I.W., Hashem, S., Yadav, S.K., Shanmugakonar, M., Al-Naemi, H.A., Haris, M., and Uddin, S. (2019). Tight Junction Proteins and Signaling Pathways in Cancer and Inflammation: A Functional Crosstalk. *Front. Physiol.* 9, 1942.
- Birchenough, G.M.H., Nystrom, E.E.L., Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016). A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* 352, 1535–1542.
- Biswa, P., and Doble, M. (2013). Production of acylated homoserine lactone by Gram-positive bacteria isolated from marine water. *FEMS Microbiol Lett* 343, 34–41.
- Blair, S.A., Kane, S.V., Clayburgh, D.R., and Turner, J.R. (2006). Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab Invest* 86, 191–201.
- Boehm, D., Krzystek-Korpacka, M., Neubauer, K., Matusiewicz, M., Berdowska, I., Zielinski, B., Paradowski, L., and Gamian, A. (2009). Paraoxonase-1 status in Crohn’s disease and ulcerative colitis: *Inflammatory Bowel Diseases* 15, 93–99.
- Bonder, M.J., Kurilshikov, A., Tigchelaar, E.F., Mujagic, Z., Imhann, F., Vila, A.V., Deelen, P., Vatanen, T., Schirmer, M., Smeekens, S.P., *et al.* (2016). The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nature Genetics* 48, 1407–1412.
- Boontham, P., Robins, A., Chandran, P., Pritchard, D., Cámara, M., Williams, P., Chuthapisith, S., McKechnie, A., Rowlands, B.J., and Eremin, O. (2008). Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clinical Science* 115, 343–351.

- Boulenc, X., Marti, E., Joyeux, H., Roques, C., Berger, Y., and Fabre, G. (1993). Importance of the paracellular pathway for the transport of a new bisphosphonate using the human CACO-2 monolayers model. *Biochemical Pharmacology* *46*, 1591–1600.
- Brown, E.M., Sadarangani, M., and Finlay, B.B. (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology* *14*, 660–667.
- Brugiroux, S., Beutler, M., Pfann, C., Garzetti, D., Ruscheweyh, H.-J., Ring, D., Diehl, M., Herp, S., Lötcher, Y., Hussain, S., *et al.* (2017). Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nature Microbiology* *2*, 16215.
- Bryan, A., Watters, C., Koenig, L., Youn, E., Olmos, A., Li, G., Williams, S.C., and Rumbaugh, K.P. (2010). Human transcriptome analysis reveals a potential role for active transport in the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* autoinducers. *Microbes and Infection* *12*, 1042–1050.
- Buisine, M.P., Desreumaux, P., Debailleul, V., Gambiez, L., Geboes, K., Ectors, N., Delescaut, M.P., Degand, P., Aubert, J.P., Colombel, J.F., *et al.* (1999). Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *5*, 24–32.
- Charlton, T.S., Nys, R.D., Netting, A., Kumar, N., Hentzer, M., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (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*, 530–541.
- Chassaing, B., Rolhion, N., Vallée, A. de, Salim, S.Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell, B.J., Söderholm, J.D., Hugot, J.-P., Colombel, J.-F., *et al.* (2011). Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J. Clin. Invest.* *121*, 966–975.
- Chassaing, B., Aitken, J.D., Malleshappa, M., and Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Current Protocols in Immunology* *104*, 15.25.1-15.25.14.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* *519*, 92–96.
- Chassaing, B., Van de Wiele, T., De Bodt, J., Marzorati, M., and Gewirtz, A.T. (2017). Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression *ex vivo* potentiating intestinal inflammation. *Gut* *66*, 1414–1427.
- Chbib, C. (2020). Impact of the structure-activity relationship of AHL analogues on quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *28*, 115282.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., and Dorsselaer, A.V. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *415*, 5.
- Cheng, H.-Y., Ning, M.-X., Chen, D.-K., and Ma, W.-T. (2019). Interactions Between the Gut Microbiota and the Host Innate Immune Response Against Pathogens. *Front. Immunol.* *10*, 607.
- Cheng, W., Wang, Z., Xiong, Y., Wu, Z., Tan, X., Yang, Y., Zhang, H., Zhu, X., Wei, H., and Tao, S. (2021). N-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone disrupts intestinal barrier and induces systemic inflammation through perturbing gut microbiome in mice. *Science of The Total Environment* *778*, 146347.
- Chhabra, S.R., Harty, C., Hooi, D.S.W., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Pritchard, D.I., and Bycroft, B.W. (2003). Synthetic Analogues of the Bacterial Signal (Quorum Sensing) Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine Lactone as Immune Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry* *46*, 97–104.
- Chung, L.K., and Raffatellu, M. (2019). G.I. pros: Antimicrobial defense in the gastrointestinal tract. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *88*, 129–137.

- Clooney, A.G., Sutton, T.D.S., Shkoporov, A.N., Holohan, R.K., Daly, K.M., O'Regan, O., Ryan, F.J., Draper, L.A., Plevy, S.E., Ross, R.P., *et al.* (2019). Whole-Virome Analysis Sheds Light on Viral Dark Matter in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Host & Microbe* *26*, 764-778.e5.
- Coleman, O.I., and Haller, D. (2019). ER Stress and the UPR in Shaping Intestinal Tissue Homeostasis and Immunity. *Front. Immunol.* *10*, 2825.
- Collard, M.K., Bardin, J., Laurin, M., and Ogier-Denis, E. (2021). The cecal appendix is correlated with greater maximal longevity in mammals. *J Anat* joa.13501.
- Cooley, M.A., Whittall, C., and Rolph, M.S. (2010). Pseudomonas signal molecule 3-oxo-C12-homoserine lactone interferes with binding of rosiglitazone to human PPAR γ . *Microbes and Infection* *12*, 231–237.
- Coombes, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* *8*, 435–446.
- Corfield, A.P. (2018). The Interaction of the Gut Microbiota with the Mucus Barrier in Health and Disease in Human. *Microorganisms* *6*, 78.
- Cornforth, D.M., Popat, R., McNally, L., Gurney, J., Scott-Phillips, T.C., Ivens, A., Diggle, S.P., and Brown, S.P. (2014). Combinatorial quorum sensing allows bacteria to resolve their social and physical environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *111*, 4280–4284.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* *140*, 1785-1794.e4.
- Cuffaro, B., Assouhoun, A.L.W., Boutillier, D., Peucelle, V., Desramaut, J., Boudebouze, S., Croyal, M., Waligora-Dupriet, A.-J., Rhimi, M., Grangette, C., *et al.* (2021). Identification of New Potential Biotherapeutics from Human Gut Microbiota-Derived Bacteria. *Microorganisms* *9*, 565.
- Dagan-Wiener, A., Di Pizio, A., Nissim, I., Bahia, M.S., Dubovski, N., Margulis, E., and Niv, M.Y. (2019). BitterDB: taste ligands and receptors database in 2019. *Nucleic Acids Research* *47*, D1179–D1185.
- Danese, S., Argollo, M., Le Berre, C., and Peyrin-Biroulet, L. (2019). JAK selectivity for inflammatory bowel disease treatment: does it clinically matter? *Gut* *68*, 1893–1899.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* *127*, 412–421.
- Darnell, J., Kerr, I., and Stark, G. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* *264*, 1415–1421.
- De Schepper, S., Verheijden, S., Aguilera-Lizarraga, J., Viola, M.F., Boesmans, W., Stakenborg, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Boeckx, B., Dierckx de Casterlé, I., *et al.* (2018). Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell* *175*, 400-415.e13.
- Deng, J., Lu, P.D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Sonenberg, N., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* *24*, 10161–10168.
- Dickerson, F., Severance, E., and Yolken, R. (2017). The microbiome, immunity, and schizophrenia and bipolar disorder. *Brain, Behavior, and Immunity* *62*, 46–52.
- Diggle, S.P., Matthijs, S., Wright, V.J., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Lamont, I.L., Kong, X., Hider, R.C., Cornelis, P., Cámara, M., *et al.* (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.

- DiMango, E., Ratner, A.J., Bryan, R., Tabibi, S., and Prince, A. (1998). Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation* *101*, 2598–2605.
- Dogra, S.K., Doré, J., and Damak, S. (2020). Gut Microbiota Resilience: Definition, Link to Health and Strategies for Intervention. *Front. Microbiol.* *11*, 572921.
- Duboc, H., Rajca, S., Rainteau, D., Benarous, D., Maubert, M.-A., Quervain, E., Thomas, G., Barbu, V., Humbert, L., Despras, G., *et al.* (2013). Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* *62*, 531–539.
- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., and Oppenheimer, N.J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* *20*, 2444–2449.
- Elinav, E., Henao-Mejia, J., and Flavell, R.A. (2013). Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. *Mucosal Immunol* *6*, 4–13.
- Engbrecht, J., and Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *81*, 4154–4158.
- Engbrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* *32*, 773–781.
- Erickson, D.L., Nsereko, V.L., Morgavi, D.P., Selinger, L.B., Rode, L.M., and Beauchemin, K.A. (2002a). Evidence of quorum sensing in the rumen ecosystem: detection of *N*-acyl homoserine lactone autoinducers in ruminal contents. *Can. J. Microbiol.* *48*, 374–378.
- Erickson, D.L., Endersby, R., Kirkham, A., Stuber, K., Vollman, D.D., Rabin, H.R., Mitchell, I., and Storey, D.G. (2002b). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* *70*, 1783–1790.
- Eum, S.Y., Jaraki, D., Bertrand, L., Andras, I.E., and Toborek, M. (2014). Disruption of epithelial barrier by quorum-sensing N-3-(oxododecanoyl)-homoserine lactone is mediated by matrix metalloproteinases. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* *306*, G992–G1001.
- Fan, H., Wang, A., Wang, Y., Sun, Y., Han, J., Chen, W., Wang, S., Wu, Y., and Lu, Y. (2019). Innate Lymphoid Cells: Regulators of Gut Barrier Function and Immune Homeostasis. *Journal of Immunology Research* *2019*, 1–15.
- Feng, P., Chai, J., Yi, H., Redding, K., Margolskee, R.F., Huang, L., and Wang, H. (2018a). Aggravated gut inflammation in mice lacking the taste signaling protein α -gustducin. *Brain, Behavior, and Immunity* *71*, 23–27.
- Feng, W., Wu, Y., Chen, G., Fu, S., Li, B., Huang, B., Wang, D., Wang, W., and Liu, J. (2018b). 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*, 1617–1629.
- Fernandez, E.M., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I.G., and Grangette, C. (2011). Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* *60*, 1050–1059.
- Franzosa, E.A., Sirota-Madi, A., Avila-Pacheco, J., Fornelos, N., Haiser, H.J., Reinker, S., Vatanen, T., Hall, A.B., Mallick, H., McIver, L.J., *et al.* (2019). Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology* *4*, 293.
- Fuqua, C., and Greenberg, E.P. (2002). LISTENING IN ON BACTERIA: ACYL-HOMOSERINE LACTONE SIGNALLING. *11*.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* *176*, 269–275.

- Gaida, M.M., Mayer, C., Dapunt, U., Stegmaier, S., Schirmacher, P., Wabnitz, G.H., and Hänsch, G.M. (2016). Expression of the bitter receptor T2R38 in pancreatic cancer: localization in lipid droplets and activation by a bacteria-derived quorum-sensing molecule. *Oncotarget* 7.
- Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., and Spring, D.R. (2011). Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways. *Chem. Rev.* 111, 28–67.
- Garrett, W.S., Gordon, J.I., and Glimcher, L.H. (2010). Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell* 140, 859–870.
- Gearry, R.B. (2016). IBD and Environment: Are There Differences between East and West. *Dig Dis* 34, 84–89.
- Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R., and Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews* 13, 3–10.
- Glasser, A.-L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.-H., Colombel, J.-F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent Invasive *Escherichia coli* Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death. *Infect Immun* 69, 5529–5537.
- Glassner, K.L., Abraham, B.P., and Quigley, E.M.M. (2020). The microbiome and inflammatory bowel disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145, 16–27.
- Glucksam-Galnoy, Y., Sananes, R., Silberstein, N., Krief, P., Kravchenko, V.V., Meijler, M.M., and Zor, T. (2013). The Bacterial Quorum-Sensing Signal Molecule N-3-Oxo-Dodecanoyl-L-Homoserine Lactone Reciprocally Modulates Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Activated Macrophages. *The Journal of Immunology* 191, 337–344.
- Goll, R., and van Beelen Granlund, A. (2015). Intestinal barrier homeostasis in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 50, 3–12.
- Gomi, K., Kikuchi, T., Tokue, Y., Fujimura, S., Uehara, A., Takada, H., Watanabe, A., and Nukiwa, T. (2006). Mouse and Human Cell Activation by N-Dodecanoyl-dl-Homoserine Lactone, a Chromobacterium violaceum Autoinducer. *IAI* 74, 7029–7031.
- Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R., and Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778, 729–756.
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., and Faure, D. (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews* 40, 86–116.
- Grassin-Delyle, S., Salvator, H., Mantov, N., Abrial, C., Brollo, M., Faisy, C., Naline, E., Couderc, L.-J., and Devillier, P. (2019). Bitter Taste Receptors (TAS2Rs) in Human Lung Macrophages: Receptor Expression and Inhibitory Effects of TAS2R Agonists. *Front. Physiol.* 10, 1267.
- Gribble, F.M., and Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 15, 226–237.
- Gupta, R.K., Chhibber, S., and Harjai, K. (2011). Acyl Homoserine Lactones from Culture Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* Accelerate Host Immunomodulation. *PLoS ONE* 6, e20860.
- Halfvarson, J., Brislawn, C.J., Lamendella, R., Vázquez-Baeza, Y., Walters, W.A., Bramer, L.M., D'Amato, M., Bonfiglio, F., McDonald, D., Gonzalez, A., *et al.* (2017). Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol* 2, 17004.
- He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., *et al.* (2007). Intestinal Bacteria Trigger T Cell-Independent Immunoglobulin A2 Class Switching by Inducing Epithelial-Cell Secretion of the Cytokine APRIL. *Immunity* 26, 812–826.

- Helander, H.F., and Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 681–689.
- Held, T.K., Weihua, X., Yuan, L., Kalvakolanu, D.V., and Cross, A.S. (1999). Gamma Interferon Augments Macrophage Activation by Lipopolysaccharide by Two Distinct Mechanisms, at the Signal Transduction Level and via an Autocrine Mechanism Involving Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1. *Infect Immun* 67, 206–212.
- Hernandez-Rocha, C., and Vande Castele, N. (2020). JAK inhibitors: current position in treatment strategies for use in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Pharmacology* 55, 99–109.
- Higashi, T., and Miller, A.L. (2017). Tricellular junctions: how to build junctions at the TRICKiest points of epithelial cells. *MBoC* 28, 2023–2034.
- Holm, A., Karlsson, T., and Vikström, E. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* lasI/rhlI quorum sensing genes promote phagocytosis and aquaporin 9 redistribution to the leading and trailing regions in macrophages. *Front. Microbiol.* 6.
- Holm, A., Magnusson, K.-E., and Vikström, E. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine Lactone Elicits Changes in Cell Volume, Morphology, and AQP9 Characteristics in Macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6.
- Hooi, D.S.W., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Williams, P., and Pritchard, D.I. (2004). Differential Immune Modulatory Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Molecules. *Infection and Immunity* 72, 6463–6470.
- Hooks, K.B., and O'Malley, M.A. (2017). Dysbiosis and Its Discontents. *MBio* 8.
- Horke, S., Witte, I., Wilgenbus, P., Altenhöfer, S., Krüger, M., Li, H., and Förstermann, U. (2008). Protective effect of paraoxonase-2 against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium homeostasis. *Biochemical Journal* 416, 395–405.
- Hornef, M.W., Frisan, T., Vandewalle, A., Normark, S., and Richter-Dahlfors, A. (2002). Toll-like Receptor 4 Resides in the Golgi Apparatus and Colocalizes with Internalized Lipopolysaccharide in Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Experimental Medicine* 195, 559–570.
- Hrdý, J., Alard, J., Couturier-Maillard, A., Boulard, O., Boutillier, D., Delacre, M., Lapadatescu, C., Cesaro, A., Blanc, P., Pot, B., *et al.* (2020). *Lactobacillus reuteri* 5454 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 5764 improve colitis while differentially impacting dendritic cells maturation and antimicrobial responses. *Sci Rep* 10, 5345.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A.D., Kaufman, R.J., and Exton, J.H. (2006). Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* 26, 3071–3084.
- Hu, R., Yuan, K., Zhou, J., Zhang, Y., Zheng, J., Zhao, Y., Huang, X., and Jin, X. (2021). Influence of *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone on human corneal epithelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 246, 426–435.
- Hudaiberdiev, S., Choudhary, K.S., Vera Alvarez, R., Gelencsér, Z., Ligeti, B., Lamba, D., and Pongor, S. (2015). Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5.
- Ireland, H., Houghton, C., Howard, L., and Winton, D.J. (2005). Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev. Dyn.* 233, 1332–1336.
- Isidro, R.A., and Appleyard, C.B. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. 15.
- Ismail, A.S., Valastyan, J.S., and Bassler, B.L. (2016). A Host-Produced Autoinducer-2 Mimic Activates Bacterial Quorum Sensing. *Cell Host & Microbe* 19, 470–480.

- Ivanov, I.I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host & Microbe* *4*, 337–349.
- Jacobi, C.A., Schiffner, F., Henkel, M., Waibel, M., Stork, B., Daubrawa, M., Eberl, L., Gregor, M., and Wesselborg, S. (2009). Effects of bacterial N-acyl homoserine lactones on human Jurkat T lymphocytes—OdDHL induces apoptosis via the mitochondrial pathway. *International Journal of Medical Microbiology* *299*, 509–519.
- Jaggupilli, A., Singh, N., Jesus, V.C.D., Duan, K., and Chelikani, P. (2018). Characterization of the Binding Sites for Bacterial Acyl Homoserine Lactones (AHLs) on Human Bitter Taste Receptors (T2Rs). *ACS Infect. Dis.* *4*, 1146–1156.
- Jahoor, A., Patel, R., Bryan, A., Do, C., Krier, J., Watters, C., Wahli, W., Li, G., Williams, S.C., and Rumbaugh, K.P. (2008). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Mediate Host Cell Proinflammatory Responses to *Pseudomonas aeruginosa* Autoinducer. *Journal of Bacteriology* *190*, 4408–4415.
- Jandhyala, S.M. (2015). Role of the normal gut microbiota. *WJG* *21*, 8787.
- Jeon, T.-I., Seo, Y.-K., and Osborne, T.F. (2011). Gut Bitter Taste Receptor Signaling Induces ABCB1 through a Mechanism Involving CCK. *Biochem J* *438*, 33–37.
- Jeruzal-Świątecka, J., Fendler, W., and Pietruszewska, W. (2020). Clinical Role of Extraoral Bitter Taste Receptors. *IJMS* *21*, 5156.
- Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K.S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjövall, H., *et al.* (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* *63*, 281–291.
- Joyce, S.A., and Gahan, C.G.M. (2017). Disease-Associated Changes in Bile Acid Profiles and Links to Altered Gut Microbiota. *Dig Dis* *35*, 169–177.
- Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M.F. (1995). A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* *95*, 55–65.
- Kagnoff, M.F. (2014). The intestinal epithelium is an integral component of a communications network. *J. Clin. Invest.* *124*, 2841–2843.
- Kahle, N.A., Brenner-Weiss, G., Overhage, J., Obst, U., and Hänsch, G.M. (2013). Bacterial quorum sensing molecule induces chemotaxis of human neutrophils via induction of p38 and leukocyte specific protein 1 (LSP1). *Immunobiology* *218*, 145–151.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., *et al.* (2008). Unique CD14+ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. *J. Clin. Invest.* JCI34610.
- Kaper, J.B., and Sperandio, V. (2005). Bacterial Cell-to-Cell Signaling in the Gastrointestinal Tract. *Infection and Immunity* *73*, 3197–3209.
- Kaplan, G.G., and Jess, T. (2016). The Changing Landscape of Inflammatory Bowel Disease: East Meets West. *Gastroenterology* *150*, 24–26.
- Kaplan, G.G., Hubbard, J., Korzenik, J., Sands, B.E., Panaccione, R., Ghosh, S., Wheeler, A.J., and Villeneuve, P.J. (2010). The Inflammatory Bowel Diseases and Ambient Air Pollution: A Novel Association. *American Journal of Gastroenterology* *105*, 2412–2419.
- Karban, A., Hartman, C., Eliakim, R., Waterman, M., Neshet, S., Barnett-Griness, O., and Shamir, R. (2007). Paraoxonase (PON)1 192R Allele Carriage is Associated with Reduced Risk of Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci* *52*, 2707–2715.

- Karlsson, T., Musse, F., Magnusson, K.-E., and Vikstrom, E. (2012a). N-Acylhomoserine lactones are potent neutrophil chemoattractants that act via calcium mobilization and actin remodeling. *Journal of Leukocyte Biology* 91, 15–26.
- Karlsson, T., Turkina, M.V., Yakymenko, O., Magnusson, K.-E., and Vikström, E. (2012b). The *Pseudomonas aeruginosa* N-Acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Molecules Target IQGAP1 and Modulate Epithelial Cell Migration. *PLoS Pathogens* 8, e1002953.
- Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., *et al.* (2008). XBP1 Links ER Stress to Intestinal Inflammation and Confers Genetic Risk for Human Inflammatory Bowel Disease. *Cell* 134, 743–756.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 573–621.
- Kiesler, P., Fuss, I.J., and Strober, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 1, 154–170.
- Kim, C.S., Gatsios, A., Cuesta, S., Lam, Y.C., Wei, Z., Chen, H., Russell, R.M., Shine, E.E., Wang, R., Wyche, T.P., *et al.* (2020). Characterization of Autoinducer-3 Structure and Biosynthesis in *E. coli*. *ACS Cent. Sci.* 6, 197–206.
- Kim, M., Galan, C., Hill, A.A., Wu, W.-J., Fehlner-Peach, H., Song, H.W., Schady, D., Bettini, M.L., Simpson, K.W., Longman, R.S., *et al.* (2018). Critical Role for the Microbiota in CX3CR1+ Intestinal Mononuclear Phagocyte Regulation of Intestinal T Cell Responses. *Immunity* 49, 151-163.e5.
- KJhn, R., Rajewsky, K., and MOiler, W. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. 12.
- Kravchenko, V.V., Kaufmann, G.F., Mathison, J.C., Scott, D.A., Katz, A.Z., Wood, M.R., Brogan, A.P., Lehmann, M., Mee, J.M., Iwata, K., *et al.* (2006). N-(3-Oxo-acyl)homoserine Lactones Signal Cell Activation through a Mechanism distinct from the Canonical Pathogen-associated Molecular Pattern Recognition Receptor Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 281, 28822–28830.
- Kravchenko, V.V., Kaufmann, G.F., Mathison, J.C., Scott, D.A., Katz, A.Z., Grauer, D.C., Lehmann, M., Meijler, M.M., Janda, K.D., and Ulevitch, R.J. (2008). Modulation of Gene Expression via Disruption of NF- κ B Signaling by a Bacterial Small Molecule. *Science* 321, 259–263.
- Krebs, J., Agellon, L.B., and Michalak, M. (2015). Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460, 114–121.
- Krug, S.M., Bojarski, C., Fromm, A., Lee, I.M., Dames, P., Richter, J.F., Turner, J.R., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2018). Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor α 2, affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis. *Mucosal Immunol* 11, 345–356.
- Kumari, A., Pasini, P., Deo, S.K., Flomenhoft, D., Shashidhar, H., and Daunert, S. (2006). Biosensing Systems for the Detection of Bacterial Quorum Signaling Molecules. *Analytical Chemistry* 78, 7603–7609.
- Kumari, A., Pasini, P., and Daunert, S. (2008). Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples. *Anal Bioanal Chem* 391, 1619–1627.
- Lamas, B., Richard, M.L., Leducq, V., Pham, H.-P., Michel, M.-L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T.W., Natividad, J.M., *et al.* (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* 22, 598–605.

- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* 157, 1013–1022.
- Landman, C., Grill, J.-P., Mallet, J.-M., Marteau, P., Humbert, L., Balc'h, E.L., Maubert, M.-A., Perez, K., Chaara, W., Brot, L., *et al.* (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.
- Latorre, R., Huynh, J., Mazzoni, M., Gupta, A., Bonora, E., Clavenzani, P., Chang, L., Mayer, E.A., De Giorgio, R., and Sternini, C. (2016). Expression of the Bitter Taste Receptor, T2R38, in Enteroendocrine Cells of the Colonic Mucosa of Overweight/Obese vs. Lean Subjects. *PLoS ONE* 11, e0147468.
- Le Gall, M., Thenet, S., Aguanno, D., Jarry, A.-C., Genser, L., Ribeiro-Parenti, L., Joly, F., Ledoux, S., Bado, A., and Le Beyec, J. (2019). Intestinal plasticity in response to nutrition and gastrointestinal surgery. *Nutrition Reviews* 77, 129–143.
- Lee, J., and Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26–41.
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., and Zhang, L.-H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol* 9, 339–343.
- Lee, R.J., Xiong, G., Kofonow, J.M., Chen, B., Lysenko, A., Jiang, P., Abraham, V., Doghramji, L., Adappa, N.D., Palmer, J.N., *et al.* (2012). T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J. Clin. Invest.* 122, 4145–4159.
- Lee, R.J., Chen, B., Redding, K.M., Margolskee, R.F., and Cohen, N.A. (2014). Mouse nasal epithelial innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules require taste signaling components. *Innate Immunity* 20, 606–617.
- Levy, E., Trudel, K., Bendayan, M., Seidman, E., Delvin, E., Elchebly, M., Lavoie, J.-C., Precourt, L.-P., Amre, D., and Sinnett, D. (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–G1261.
- Li, Q., Ren, Y., and Fu, X. (2019). Inter-kingdom signaling between gut microbiota and their host. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 2383–2389.
- Li, Y., Zhou, H., Zhang, Y., Chen, C., Huang, B., Qu, P., Zeng, J., E, S., Zhang, X., and Liu, J. (2015). *N*-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone promotes the induction of regulatory T-cells by preventing human dendritic cell maturation. *Exp Biol Med (Maywood)* 240, 896–903.
- Lin, L., and Zhang, J. (2017). Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology* 18.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230.
- Lu, P., Zhang, C.-H., Lifshitz, L.M., and ZhuGe, R. (2017). Extraoral bitter taste receptors in health and disease. *Journal of General Physiology* 149, 181–197.
- Luettig, J., Rosenthal, R., Barmeyer, C., and Schulzke, J.D. (2015). Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers* 3, e977176.
- Lustri, B.C., Sperandio, V., and Moreira, C.G. (2017). Bacterial Chat: Intestinal Metabolites and Signals in Host-Microbiota-Pathogen Interactions. *Infect Immun* 85, e00476-17, e00476-17.
- Lyte, M. (2004). Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends in Microbiology* 12, 14–20.

- Lyte, M., and Ernst, S. (1992). Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sciences* 50, 203–212.
- Maloy, K.J., and Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 298–306.
- Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., and Guarner, F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 599–608.
- Martin-Gallausiaux, C., Béguet-Crespel, F., Marinelli, L., Jamet, A., Ledue, F., Blottière, H.M., and Lapaque, N. (2018). Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells. *Sci Rep* 8, 9742.
- Maruvada, P., Leone, V., Kaplan, L.M., and Chang, E.B. (2017). The Human Microbiome and Obesity: Moving beyond Associations. *Cell Host & Microbe* 22, 589–599.
- Matricon, J. (2010). Immunopathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Med Sci (Paris)* 26, 405–410.
- Maurer, S., Wabnitz, G.H., Kahle, N.A., Stegmaier, S., Prior, B., Giese, T., Gaida, M.M., Samstag, Y., and Hänsch, G.M. (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.
- Maurice, N.M., Bedi, B., Yuan, Z., Goldberg, J.B., Koval, M., Hart, C.M., and Sadikot, R.T. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Induced Host Epithelial Cell Mitochondrial Dysfunction. *Sci Rep* 9, 1–15.
- Mayer, M.L., Sheridan, J.A., Blohmke, C.J., Turvey, S.E., and Hancock, R.E.W. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* Autoinducer 3O-C12 Homoserine Lactone Provokes Hyperinflammatory Responses from Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *PLOS ONE* 6, e16246.
- McClure, R., and Massari, P. (2014). TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front. Immunol.* 5.
- McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* 483, 345–349.
- MetaHIT Consortium, Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., *et al.* (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.
- MetaHIT Consortium (additional members), Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., *et al.* (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180.
- Michielan, A., and D'Inca, R. (2015). Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators of Inflammation* 2015, 1–10.
- Miller, S.T., Xavier, K.B., Campagna, S.R., Taga, M.E., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., and Hughson, F.M. (2004). *Salmonella typhimurium* Recognizes a Chemically Distinct Form of the Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2. *Molecular Cell* 15, 677–687.
- Mion, S., Rémy, B., Plener, L., Chabrière, É., and Daudé, D. (2019). Quorum sensing et quorum quenching : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ? *Med Sci (Paris)* 35, 31–38.
- Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T.T., Pallone, F., and Monteleone, G. (2011). Aryl Hydrocarbon Receptor-Induced Signals Up-regulate IL-22 Production and Inhibit Inflammation in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology* 141, 237-248.e1.

- Moreira Lopes, T.C., Mosser, D.M., and Gonçalves, R. (2020). Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. *Inflamm. Res.* *69*, 1163–1172.
- Moura-Alves, P., Puyskens, A., Stinn, A., Klemm, M., Gühlich-Bornhof, U., Dorhoi, A., Furkert, J., Kreuchwig, A., Protze, J., Lozza, L., *et al.* (2019). Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Science (New York, N.Y.)* *366*.
- Mukherjee, S., and Bassler, B.L. (2019a). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol* *17*, 371–382.
- Mukherjee, S., and Bassler, B.L. (2019b). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology* *17*, 371–382.
- Mukhopadhyaya, I., Segal, J.P., Carding, S.R., Hart, A.L., and Hold, G.L. (2019). The gut virome: the ‘missing link’ between gut bacteria and host immunity? *Therap Adv Gastroenterol* *12*, 175628481983662.
- Muldoon, J.J., Chuang, Y., Bagheri, N., and Leonard, J.N. (2020). Macrophages employ quorum licensing to regulate collective activation. *Nat Commun* *11*, 878.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* *11*, 723–737.
- Naik, S., Kelly, E.J., Meijer, L., Pettersson, S., and Sanderson, I.R. (2001). Absence of Toll-Like Receptor 4 Explains Endotoxin Hyporesponsiveness in Human Intestinal Epithelium: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* *32*, 449–453.
- Naito, Y., and Yoshikawa, T. (2005). Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Molecular Aspects of Medicine* *26*, 379–390.
- Nathan, C., and Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell* *140*, 871–882.
- Nealson, K.H., and Hastings, J.W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews* *43*, 496–518.
- Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W. (1970). Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System I. *Journal of Bacteriology* *104*, 313–322.
- Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., *et al.* (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* *446*, 557–561.
- Neurath, M.F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* *14*, 329–342.
- Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., *et al.* (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet* *390*, 2769–2778.
- Nicholson, L.B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry* *60*, 275–301.
- Niessen, C.M. (2007). Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology* *127*, 2525–2532.
- Ning, L., Lou, X., Zhang, F., and Xu, G. (2019). Nuclear Receptors in the Pathogenesis and Management of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators of Inflammation* *2019*, 1–13.
- Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., and Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* *11*, 1–10.
- Norman, J.M., Handley, S.A., Baldrige, M.T., Droit, L., Liu, C.Y., Keller, B.C., Kambal, A., Monaco, C.L., Zhao, G., Fleshner, P., *et al.* (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* *160*, 447–460.
- Norsworthy, A.N., and Visick, K.L. (2013). Gimme shelter: how *Vibrio fischeri* successfully navigates an animal’s multiple environments. *Front. Microbiol.* *4*.
- Novick, R.P., and Geisinger, E. (2008). Quorum Sensing in Staphylococci. *27*.
- Odenwald, M.A., and Turner, J.R. (2016). The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* *14*, 9–21.

- Ohland, C.L., and Jobin, C. (2015). Microbial Activities and Intestinal Homeostasis: A Delicate Balance Between Health and Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 1, 28–40.
- Okumura, R., and Takeda, K. (2018). Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflammation and Regeneration* 38.
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A.B., and Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.* 10, 1084.
- Panea, C., Farkas, A.M., Goto, Y., Abdollahi-Roodsaz, S., Lee, C., Koscsó, B., Gowda, K., Hohl, T.M., Bogunovic, M., and Ivanov, I.I. (2015). Intestinal Monocyte-Derived Macrophages Control Commensal-Specific Th17 Responses. *Cell Reports* 12, 1314–1324.
- Papenfort, K., and Bassler, B.L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14, 576–588.
- Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature* 437, 759–763.
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 141–153.
- Peyrottes, A., Coquant, G., Brot, L., Rainteau, D., Seksik, P., Grill, J.-P., and Mallet, J.-M. (2020). Anti-Inflammatory Effects of Analogues of N-Acyl Homoserine Lactones on Eukaryotic Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Postat, J., and Bousso, P. (2019). Quorum Sensing by Monocyte-Derived Populations. *Front. Immunol.* 10, 2140.
- Postat, J., Olekhnovitch, R., Lemaître, F., and Bousso, P. (2018). A Metabolism-Based Quorum Sensing Mechanism Contributes to Termination of Inflammatory Responses. *Immunity* 49, 654-665.e5.
- Précourt, L.-P., Marcil, V., Ntimbane, T., Taha, R., Lavoie, J.-C., Delvin, E., Seidman, E.G., Beaulieu, J.-F., and Levy, E. (2012). Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 303, G623–G634.
- Prescott, R.D., and Decho, A.W. (2020). Flexibility and Adaptability of Quorum Sensing in Nature. *Trends in Microbiology* S0966842X19303191.
- Quévrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermúdez-Humarán, L.G., Pigneur, B., *et al.* (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn’s disease. *Gut* 65, 415–425.
- Quevrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermudez-Humaran, L.G., Pigneur, B., *et al.* (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn’s disease. *Gut*.
- Rajput, A., and Kumar, M. (2017). In silico analyses of conservational, functional and phylogenetic distribution of the LuxI and LuxR homologs in Gram-positive bacteria. *Sci Rep* 7, 6969.
- Ramos, G.P., and Papadakis, K.A. (2019). Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clinic Proceedings* 94, 155–165.
- Reen, F.J., Gutiérrez-Barranquero, J.A., McCarthy, R.R., Woods, D.F., Scarciglia, S., Adams, C., Fog Nielsen, K., Gram, L., and O’Gara, F. (2019). Quorum Sensing Signaling Alters Virulence Potential and Population Dynamics in Complex Microbiome-Host Interactomes. *Front. Microbiol.* 10, 2131.

- Richard, M.L., and Sokol, H. (2019). The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., and Mele, M. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7, 14.
- Ritchie, A.J., Yam, A.O.W., Tanabe, K.M., Rice, S.A., and Cooley, M.A. (2003). Modification of In Vivo and In Vitro T- and B-Cell-Mediated Immune Responses by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Infection and Immunity* 71, 4421–4431.
- Ritchie, A.J., Jansson, A., Stallberg, J., Nilsson, P., Lysaght, P., and Cooley, M.A. (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, 1648–1655.
- Ritchie, A.J., Whittall, C., Lazenby, J.J., Chhabra, S.R., Pritchard, D.I., and Cooley, M.A. (2007). The immunomodulatory *Pseudomonas aeruginosa* signalling molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone enters mammalian cells in an unregulated fashion. *Immunology and Cell Biology* 85, 596–602.
- Rodriguez, D., Morrison, C.J., and Overall, C.M. (2010). Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 39–54.
- Rothem, L., Hartman, C., Dahan, A., Lachter, J., Eliakim, R., and Shamir, R. (2007). Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radical Biology and Medicine* 43, 730–739.
- Roudsari, N.M. (2020). PPAR γ A turning point for irritable bowel syndrome treatment. *Life Sciences* 10.
- Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 313–323.
- Rousseaux, C., Lefebvre, B., Dubuquoy, L., Lefebvre, P., Romano, O., Auwerx, J., Metzger, D., Wahli, W., Desvergne, B., Naccari, G.C., *et al.* (2005). Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Journal of Experimental Medicine* 201, 1205–1215.
- Salminen, S., Collado, M.C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E.M.M., Sanders, M.E., Shamir, R., Swann, J.R., Szajewska, H., *et al.* (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 649–667.
- Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 3, 390.
- Schirmer, M., Garner, A., Vlamakis, H., and Xavier, R.J. (2019). Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Microbiol* 17, 497–511.
- Schoultz, I., and Keita, Å. (2019). Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease—Focusing on Intestinal Barrier Function. *Cells* 8, 193.
- Schroeder, B.O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2011). Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature* 469, 419–423.
- Schultz, M., Strauch, U.G., Linde, H.-J., Watzl, S., Obermeier, F., Göttl, C., Dunger, N., Grunwald, N., Schölmerich, J., and Rath, H.C. (2004). Preventive Effects of *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 on Acute and Chronic Intestinal Inflammation in Two Different Murine Models of Colitis. *Clin Vaccine Immunol* 11, 372–378.

- Schuster, M., Joseph Sexton, D., Diggle, S.P., and Peter Greenberg, E. (2013). Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 43–63.
- Schwarzer, C., Ravishankar, B., Patanwala, M., Shuai, S., Fu, Z., Illek, B., Fischer, H., and Machen, T.E. (2014). Thapsigargin blocks *Pseudomonas aeruginosa* homoserine lactone-induced apoptosis in airway epithelia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 306, C844–C855.
- Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, P., and Seeley, R.R. (2003). *Anatomy & physiology* (Boston: McGraw-Hill).
- Seksik, P. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237–242.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology* 14, e1002533.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233, 6425–6440.
- Shi, N., Li, N., Duan, X., and Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Med Res* 4, 14.
- Shiner, E.K., Rumbaugh, K.P., and Williams, S.C. (2005). Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev* 29, 935–947.
- Shiner, E.K., Terentyev, D., Bryan, A., Sennoune, S., Martinez-Zaguilan, R., Li, G., Gyorke, S., Williams, S.C., and Rumbaugh, K.P. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling. *Cell Microbiol* 8, 1601–1610.
- Shreiner, A.B., Kao, J.Y., and Young, V.B. (2015). The gut microbiome in health and in disease: Current Opinion in Gastroenterology 31, 69–75.
- Silpe, J.E., and Bassler, B.L. (2019). A Host-Produced Quorum-Sensing Autoinducer Controls a Phage Lysis-Lysogeny Decision. *Cell* 176, 268-280.e13.
- Singh, P.K., Yadav, V.K., Kalia, M., Sharma, D., Pandey, D., and Agarwal, V. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxo-dodecanoyl)-l-homoserine lactone triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in neutrophils through calcium signaling. *Med Microbiol Immunol*.
- Skindersoe, M.E., Zeuthen, L.H., Brix, S., Fink, L.N., Lazenby, J., Whittall, C., Williams, P., Diggle, S.P., Froekiaer, H., Cooley, M., *et al.* (2009). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55, 335–345.
- Slifer, Z.M., and Blikslager, A.T. (2020). The Integral Role of Tight Junction Proteins in the Repair of Injured Intestinal Epithelium. *Int J Mol Sci* 21.
- Smith, A.M., Rahman, F.Z., Hayee, B., Graham, S.J., Marks, D.J.B., Sewell, G.W., Palmer, C.D., Wilde, J., Foxwell, B.M.J., Gloger, I.S., *et al.* (2009). Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *Journal of Experimental Medicine* 206, 1883–1897.
- Smith, J.L., Fratamico, P.M., and Yan, X. (2011). Eavesdropping by Bacteria: The Role of SdiA in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Quorum Sensing. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 169–178.
- Smith, R.S., Fedyk, E.R., Springer, T.A., Mukaida, N., Iglewski, B.H., and Phipps, R.P. (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- κ B and Activator Protein-2. *The Journal of Immunology* 167, 366–374.

Smith, R.S., Kelly, R., Iglewski, B.H., and Phipps, R.P. (2002a). The *Pseudomonas* Autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone Induces Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Production in Human Lung Fibroblasts: Implications for Inflammation. *The Journal of Immunology* *169*, 2636–2642.

Smith, R.S., Harris, S.G., Phipps, R., and Iglewski, B. (2002b). The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)Homoserine Lactone Contributes to Virulence and Induces Inflammation In Vivo. *Journal of Bacteriology* *184*, 1132–1139.

Smythies, L.E., Sellers, M., Clements, R.H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W.H., Orenstein, J.M., and Smith, P.D. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* *115*, 66–75.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., *et al.* (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 16731–16736.

Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., and Doré, J. (2009). Low Counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in Colitis Microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases* *15*, 1183–1189.

Sommer, F., Anderson, J.M., Bharti, R., Raes, J., and Rosenstiel, P. (2017). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol* *15*, 630–638.

Song, D., Meng, J., Cheng, J., Fan, Z., Chen, P., Ruan, H., Tu, Z., Kang, N., Li, N., Xu, Y., *et al.* (2019). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing metabolite induces host immune cell death through cell surface lipid domain dissolution. *Nat Microbiol* *4*, 97–111.

de Souza, H.S.P., and Fiocchi, C. (2016). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* *13*, 13–27.

Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2003). Bacteria–host communication: The language of hormones. *PNAS* *100*, 8951–8956.

Sprinz, H., Kundel, D.W., Dammin, G.J., Horowitz, R.E., Schneider, H., and Formal, S.B. (1961). The response of the germfree guinea pig to oral bacterial challenge with *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Am J Pathol* *39*, 681–695.

Stadnyk, A.W. (2002). Intestinal Epithelial Cells as a Source of Inflammatory Cytokines and Chemokines. *Canadian Journal of Gastroenterology* *16*, 241–246.

Su, L., Nalle, S.C., Shen, L., Turner, E.S., Singh, G., Breskin, L.A., Khramtsova, E.A., Khramtsova, G., Tsai, P.Y., Fu, Y.X., *et al.* (2013). TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* *145*, 407–415.

Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Assche, G.V., Geboes, K., Ceuppens, J.L., and Rutgeerts, P. (2002). Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn’s disease. *Am J Gastroenterology* *97*, 2000–2004.

Swearingen, M.C., Sabag-Daigle, A., and Ahmer, B.M.M. (2013). Are There Acyl-Homoserine Lactones within Mammalian Intestines? *Journal of Bacteriology* *195*, 173–179.

Swidsinski, A. (2005). Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence *in situ* hybridization study in mice. *WJG* *11*, 1131.

Tait Wojno, E.D., and Artis, D. (2012). Innate Lymphoid Cells: Balancing Immunity, Inflammation, and Tissue Repair in the Intestine. *Cell Host & Microbe* *12*, 445–457.

Takiishi, T., Fenero, C.I.M., and Câmara, N.O.S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* *5*, e1373208.

- Tanos, B.E., Yeaman, C., and Rodriguez-Boulan, E. (2018). An emerging role for IQGAP1 in tight junction control. *Small GTPases* 9, 375–383.
- Tao, S., Luo, Y., Bin He, Liu, J., Qian, X., Ni, Y., and Zhao, R. (2016). Paraoxonase 2 modulates a proapoptotic function in LS174T cells in response to quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Scientific Reports* 6.
- Tao, S., Sun, Q., Cai, L., Geng, Y., Hua, C., Ni, Y., and Zhao, R. (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. *J Cell Physiol* 234, 3621–3633.
- Tao, S., Xiong, Y., Han, D., Pi, Y., Zhang, H., and Wang, J. (2021). N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts intestinal epithelial barrier through triggering apoptosis and collapsing extracellular matrix and tight junction. *J Cell Physiol* 236, 5771–5784.
- Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J.C., Standiford, T.J., Ishiguro, M., and Yamaguchi, K. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* Autoinducer N-3-Oxododecanoyl Homoserine Lactone Accelerates Apoptosis in Macrophages and Neutrophils. *Infection and Immunity* 71, 5785–5793.
- Teiber, J.F., Horke, S., Haines, D.C., Chowdhary, P.K., Xiao, J., Kramer, G.L., Haley, R.W., and Draganov, D.I. (2008). Dominant Role of Paraoxonases in Inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Infection and Immunity* 76, 2512–2519.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G.S.A.B., Bycroft, B.W., and Pritchard, D.I. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone Has Immunomodulatory Activity. *Infection and Immunity* 66, 36–42.
- The Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214.
- The UK IBD Genetics Consortium and The Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (2009). Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 41, 1330–1334.
- Thomas, G.L., Böhner, C.M., Williams, H.E., Walsh, C.M., Ladlow, M., Welch, M., Bryant, C.E., and Spring, D.R. (2006). Immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing small molecule probes on mammalian macrophages. *Mol. BioSyst.* 2, 132–137.
- Thompson, J.A., Oliveira, R.A., Djukovic, A., Ubeda, C., and Xavier, K.B. (2015). Manipulation of the Quorum Sensing Signal AI-2 Affects the Antibiotic-Treated Gut Microbiota. *Cell Reports* 10, 1861–1871.
- Tobias, N.J., Brehm, J., Kresovic, D., Brameyer, S., Bode, H.B., and Heermann, R. (2020). New Vocabulary for Bacterial Communication. *ChemBioChem* 21, 759–768.
- Tran, H.T.T., Herz, C., Ruf, P., Stetter, R., and Lamy, E. (2018). Human T2R38 Bitter Taste Receptor Expression in Resting and Activated Lymphocytes. *Frontiers in Immunology* 9.
- Tréton, X., Pédruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Grodet, A., Panis, Y., Groyer, A., Moreau, R., Bouhnik, Y., Daniel, F., and Ogier-Denis, E. (2011). Altered Endoplasmic Reticulum Stress Affects Translation in Inactive Colon Tissue From Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 141, 1024–1035.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., and Gordon, J.I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature* 449, 804–810.
- Turnbull, A.R., Murphy, R., Behrends, V., Lund-Palau, H., Simbo, A., Mariveles, M., Alton, E.W.F.W., Bush, A., Shoemark, A., and Davies, J.C. (2018). Impact of T2R38

Receptor Polymorphisms on *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 197, 1635–1638.

Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 799–809.

Turner, A., Chijoff, E., Veysey, M., Keely, S., Scarlett, C.J., Lucock, M., and Beckett, E.L. (2019). Interactions between taste receptors and the gastrointestinal microbiome in inflammatory bowel disease. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism* 18, 100106.

Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., *et al.* (2006). Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology* 131, 117–129.

Verbeurgt, C., Veithen, A., Carlot, S., Tarabichi, M., Dumont, J.E., Hassid, S., and Chatelain, P. (2017). The human bitter taste receptor T2R38 is broadly tuned for bacterial compounds. *PLOS ONE* 12, e0181302.

Viennois, E., Merlin, D., Gewirtz, A.T., and Chassaing, B. (2017). Dietary Emulsifier-Induced Low-Grade Inflammation Promotes Colon Carcinogenesis. *Cancer Res* 77, 27–40.

Vijay-Kumar, M., Chassaing, B., Kumar, M., Baker, M., and Singh, V. (2014). Mammalian gut immunity. *Biomed J* 37, 246.

Vikström, E., Magnusson, K.-E., and Pivoriūnas, A. (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, 1512–1518.

Vikström, E., Tafazoli, F., and Magnusson, K.-E. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)- L -homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS Letters* 580, 6921–6928.

Vikstrom, E., Tafazoli, F., and Magnusson, K.E. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-l-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS Lett* 580, 6921–6928.

Vikström, E., Bui, L., Konradsson, P., and Magnusson, K.-E. (2009). The junctional integrity of epithelial cells is modulated by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms. *Experimental Cell Research* 315, 313–326.

Vikström, E., Bui, L., Konradsson, P., and Magnusson, K.-E. (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, 584–597.

Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolari, T., and Castegna, A. (2019). The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front. Immunol.* 10, 1462.

Vogt, N.M., Kerby, R.L., Dill-McFarland, K.A., Harding, S.J., Merluzzi, A.P., Johnson, S.C., Carlsson, C.M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., *et al.* (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer’s disease. *Sci Rep* 7, 13537.

Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Baxmann, S., Schmidt, K., Schwind, B., Duchrow, M., Wohlschläger, C., Feller, A.C., and Stange, E.F. (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, 745–752.

Welcome, M.O. (2020). The bitterness of genitourinary infections: Properties, ligands of genitourinary bitter taste receptors and mechanisms linking taste sensing to inflammatory processes in the genitourinary tract. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 247, 101–110.

Whiteley, M., Diggle, S.P., and Greenberg, E.P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551, 313–320.

- Wibowo, A.A., Pardjianto, B., Sumitro, S.B., Kania, N., and Handono, K. (2019). Decreased expression of MUC2 due to a decrease in the expression of lectins and apoptotic defects in colitis patients. *Biochemistry and Biophysics Reports* *19*, 100655.
- Windsor, J.W., and Kaplan, G.G. (2019). Evolving Epidemiology of IBD. *Curr Gastroenterol Rep* *21*, 40.
- Wirtz, S., Popp, V., Kindermann, M., Gerlach, K., Weigmann, B., Fichtner-Feigl, S., and Neurath, M.F. (2017). Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc* *12*, 1295–1309.
- Won, M.-Y., Oyama, L.B., Courtney, S.J., Creevey, C.J., and Huws, S.A. (2020). Can rumen bacteria communicate to each other? *Microbiome* *8*, 23.
- Woo, K., Kim, D.H., Oh, M.H., Park, H.S., and Choi, C.H. (2021). N-3-Hydroxy Dodecanoyl-DL-homoserine Lactone (OH-dDHL) Triggers Apoptosis of Bone Marrow-Derived Macrophages through the ER- and Mitochondria-Mediated Pathways. *IJMS* *22*, 7565.
- Wu, L. (2005). Recognition of Host Immune Activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* *309*, 774–777.
- Wu, S., Liu, J., Liu, C., Yang, A., and Qiao, J. (2020). Quorum sensing for population-level control of bacteria and potential therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* *77*, 1319–1343.
- Yadav, V.K., Singh, P.K., Kalia, M., Sharma, D., Singh, S.K., and Agarwal, V. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-3-oxo-dodecanoyl-l-homoserine lactone activates human platelets through intracellular calcium-mediated ROS generation. *International Journal of Medical Microbiology* *308*, 858–864.
- Yeshi, K., Ruscher, R., Hunter, L., Daly, N.L., Loukas, A., and Wangchuk, P. (2020). Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products. *JCM* *9*, 1273.
- Yu, Y., Hao, G., Zhang, Q., Hua, W., Wang, M., Zhou, W., Zong, S., Huang, M., and Wen, X. (2015). Berberine induces GLP-1 secretion through activation of bitter taste receptor pathways. *Biochemical Pharmacology* *97*, 173–177.
- Zaph, C., Troy, A.E., Taylor, B.C., Berman-Booty, L.D., Guild, K.J., Du, Y., Yost, E.A., Gruber, A.D., May, M.J., Greten, F.R., *et al.* (2007). Epithelial-cell-intrinsic IKK- β expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* *446*, 552–556.
- Zelante, T., Iannitti, R.G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., *et al.* (2013). Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Immunity* *39*, 372–385.
- Zhang, Y.-Z. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *WJG* *20*, 91.
- Zhang, C., Liu, L., Sun, W., Qin, S., Qin, L., and Wang, X. (2015). Expressions of E-cadherin, p120ctn, β -catenin and NF- κ B in ulcerative colitis. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [Med. Sci.]* *35*, 368–373.
- Zhang, J., Gong, F., Li, L., Zhao, M., and Song, J. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by activating the unfolded protein response. *Biomedical Reports* *2*, 233–238.
- Zhou, L., Huang, W., Xu, Y., Gao, C., Zhang, T., Guo, M., Liu, Y., Ding, J., Qin, L., Xu, Z., *et al.* (2018). Sweet Taste Receptors Mediated ROS-NLRP3 Inflammasome Signaling Activation: Implications for Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes Research* *2018*, 1–15.
- Ziesche, L., Wolter, L., Wang, H., Brinkhoff, T., Pohlner, M., Engelen, B., Wagner-Döbler, I., and Schulz, S. (2019). An Unprecedented Medium-Chain Diunsaturated N-acylhomoserine Lactone from Marine Roseobacter Group Bacteria. *Marine Drugs* *17*, 20.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zimmermann, S., Wagner, C., Muller, W., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U., and Hansch, G.M. (2006). Induction of Neutrophil Chemotaxis by the Quorum-Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *INFECT. IMMUN.* 74, 6.

Zuo, T., Lu, X.-J., Zhang, Y., Cheung, C.P., Lam, S., Zhang, F., Tang, W., Ching, J.Y.L., Zhao, R., Chan, P.K.S., *et al.* (2019). Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut* 68, 1169–1179.

ANNEXES

ANNEXES : LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications orales :

- Coquant G., D. Aguanno, L. de Sordi, P. Seksik – “3-oxo-C12:2, a Quorum Sensing molecule from the gut, exerts anti-inflammatory effects through a bitter taste receptor”; **International Symposium on Gut Microbiology (INRAE-Rowett)**, Virtuel, octobre 2021
- Coquant G., D. Aguanno, P. Seksik, L. de Sordi – “The Acyl-Homoserine Lactone 3-oxo-C12:2, Quorum Sensing molecule from the gastrointestinal tract, exerts anti-inflammatory effects via a bitter taste receptor»; **Annual Doctoral School day meeting**, Paris, Mai 2021
- **Coquant G.**, D. Aguanno, P. Seksik, L. de Sordi – “The Acyl-Homoserine Lactone 3-oxo-C12:2, Quorum Sensing molecule from the gastrointestinal tract, exerts anti-inflammatory effects via a bitter taste receptor»; **Congrès annuel du Club d’Etudes des Cellules Epithéliales Digestives (CECED)**, Virtuel, Mars 2021 - **Recipient of the Claude Rozé prize**
- Coquant G., D. Aguanno, P. Seksik, L. de Sordi – “The Acyl-Homoserine Lactone 3-oxo-C12:2, Quorum Sensing molecule from the gastrointestinal tract, exerts anti-inflammatory effects via a bitter taste receptor”; **Congrès annuel du Club d’Etudes des Cellules Epithéliales Digestives (CECED)**, Paris – *Annulé dû à la crise du Covid-19*

Posters :

- Coquant G., Aguanno D., Peyrottes A., Brot L., Belloir C., Briand L., Thenet S., Grill J-P., De Sordi L., Seksik P., – “3-oxo-C12:2, a Quorum Sensing molecule from the gut, exerts anti-inflammatory effects through a bitter taste receptor”, **16th Congress of European Crohn’s and Colitis Organisation**, virtuel, Juillet 2021
- Coquant G., Aguanno D., Seksik P., de Sordi L. – “3-oxo-C12:2, a Quorum Sensing molecule from the gut, exerts anti-inflammatory effects through a bitter taste receptor”; **15th Congress of European Crohn’s and Colitis Organisation**, Vienna, Austria, February 2020
- Coquant G., D. Aguanno, P. Seksik, L. de Sordi. – “3-oxo-C12:2, a quorum sensing molecule from gut microbiota, exerts anti-inflammatory effects on gut immune cells through a bitter taste receptor” **Séminaire annuel du Centre de Recherche Saint-Antoine**, Paris, France, November 2019
- Coquant G., D. Aguanno, P. Seksik, L. de Sordi. – “3-oxo-C12:2, a quorum sensing molecule from gut microbiota, exerts anti-inflammatory effects on gut immune cells through a bitter taste receptor”; **“Microbiology, the core of One Health concept” congress**, Paris, France, March 2019

Quel est le rôle du microbiote intestinal dans les MICI ?

Vers des stratégies thérapeutiques de modulation de microbiote

GARANNE COQUANT*,
PAUL MIC LELIANN*,
PHILIPPE SESKIN**

* Sorbonne université INSERM, centre de recherche Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France.
** Sorbonne de gastroentérologie, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France.
philippe.seskin@apm.1r

L'athypsiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) implique une réponse inflammatoire exacerbée de l'intestin en réponse à des facteurs combinés tels que des facteurs environnementaux, génétiques, et le microbiote intestinal. Grâce à l'avènement d'outils nouveaux, on assiste aujourd'hui à une véritable redécouverte de ce monde microbien intestinal. Il s'intègre dans un écosystème digestif extrêmement complexe, et est responsable de fonctions physiologiques importantes. Les MICI restent le champ médical exemplaire pour étudier l'impact du microbiote intestinal en santé humaine. La dysbiose a été initialement décrite au cours de ces maladies et cela a initié des avancées majeures dans la compréhension de ces maladies et des développements thérapeutiques innovants. Répondre à la question du rôle du microbiote intestinal dans les MICI reste donc pertinent.

Dysbiose compositionnelle : bactérienne, fongique, virale

Plutôt que l'identification de bactéries marqueurs, ce sont des profils compositionnels et fonctionnels qui témoignent d'une dysbiose. Chez les patients ayant une MICI, il existe une dysbiose caractérisée par un déséquilibre des populations de micro-organismes composant le microbiote, accompagnée d'une diminution de la diversité (*1*, *tableau*).

Les changements des populations bactériennes ont été très étudiés dans le cadre des MICI. On observe une diminution des bactéries « bénéfiques » telles que celles appartenant au phylum des *Firmicutes*, tandis que la proportion de bactéries présumées délétères (pro-inflammatoires), comme les *Proteobacteria*, est amplifiée. Certaines bactéries retrouvées typiquement au cours des MICI, comme les *Escherichia coli* adhérents et invasifs (AIEC) – présents chez un tiers des patients atteints de maladie de Crohn ileale – ont été particulièrement étudiés. L'inflammation, délétère pour la barrière intestinale, facilite la colonisation par les AIEC, résultant en une réaction pro-inflammatoire exacerbée et témoignait de la rupture de la symbiose hôte-microbiote.

Bien que nous n'ayons pas encore exploré que les bactéries, les champignons semblent également jouer un rôle au cours des MICI. La composition et la diversité du

mycobiome de l'écosystème intestinal sont perturbées. De plus, il existe des interactions spécifiques entre bactéries et champignons illustrant un dialogue inter-reine, avec des différences entre les patients atteints d'une rectocolite hémorragique et ceux atteints de la maladie de Crohn *2*.

Également présente dans le microbiote, l'impact de la population virale (virus des eucaryotes, bactériophages) est assez peu étudié dans le cadre des MICI. Il a néanmoins été montré une altération du virome intestinal au cours de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique, avec une augmentation des bactériophages. Il en émerge donc un modèle où le virome contribue, tout comme les bactéries, à cette dysbiose *3*.

Les interactions au sein de l'écosystème intestinal, entre micro-organismes (bactérie-bactérie) ainsi qu'entre deux règnes (bactère-champignon ou bactérie-hôte) sont un autre domaine d'étude pour la compréhension des MICI. En effet, le partimoine génétique de l'hôte agit sur la composition du microbiote. Des polymorphismes de certains gènes impliqués dans le dialogue hôte-microbiote (NOD2, CARD9, etc.) sont retrouvés chez les patients ayant une MICI. La complexité de ces interactions et leur impact sont à l'étude au cours des MICI.

Dysbiose fonctionnelle

Les perturbations écologiques observées au cours des MICI ne se limitent pas à une dysbiose compositionnelle. Il existe aussi une perte de certaines fonctions symbiotiques au cours de l'inflammation intestinale. Les techniques dites « omics » permettent désormais d'obtenir des informations sur les espèces bactériennes (séquençage de nouvelle génération à haut débit) mais aussi sur les fonctions métaboliques du microbiome (métagénomique, métabolomique, protéomique).

Différentes anomalies métaboliques secondaires à une dysbiose associée aux MICI ont été décrites, et leurs mécanismes d'action sur les voies immunitaires et la réaction inflammatoire sont actuellement à l'étude (*4*, *figure*). Au cours des MICI, des fonctions importantes pour l'homéostasie intestinale sont altérées, voici quelques exemples. Les acides gras à chaîne courte, tels que le butyrate, représentent une source d'énergie pour les cellules et les bactéries et peuvent aussi exercer une modu-

DYSBIOSE COMPOSITIONNELLE AU COURS DES MICI

Diminués dans les MICI	Augmentés dans les MICI
Composition microbienne	
<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Clostridium</i> , groupes IV et XIVa <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> <i>Roseburia</i> <i>Sutterella</i> <i>Bacteroides</i>	<i>Escherichia coli</i> entéro-invasif
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Fusobacterium</i> spp. <i>Ruminococcus gnavus</i> <i>Pasteurellaceae</i> <i>Verrucomicrobiales</i> <i>Candida</i>
	<i>Clavospora listimae</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Cyberindrella jadinii</i>

Tableau. MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales

lation de l'expression des gènes et activer la prolifération cellulaire et la réponse immunitaire. Ils sont issus de la fermentation bactérienne des fibres végétales. Les espèces capables de cette digestion sont diminuées en situation inflammatoire. Les métabolites du tryptophane modifient la physiologie de l'hôte non seulement en diminuant le tryptophane disponible mais aussi en produisant les dérivés indoles qui activent le récepteur d'aryl hydrocarbonane (AhR) qui joue un rôle clé dans l'intestin.

La modification du métabolisme du tryptophane, avec notamment une diminution de la production d'agoniste AHR observée dans le microbiome des patients atteints de MICI *4*. Parmi les molécules rencontrées par le microbiote, les acides biliaires occupent une place primordiale. Synthétisés par le foie, ils subissent des modifications moléculaires importantes portées par le microbiote (déconjugaison, transformation, désulfatation, isomérisation, etc.) et représentent donc le produit emblématique d'un co-métabolisme. Au cours des MICI, les modifications de l'écosystème bactérien entraînent donc de fait une altération du métabolisme des acides biliaires avec une augmentation des acides biliaires conjugués et sulfatés et une diminution des acides biliaires secondaires.

Ces profils altérés d'acides biliaires fécaux peuvent être utilisés pour le diagnostic et l'évaluation des patients atteints de MICI. Les acides biliaires secondaires ont des propriétés anti-inflammatoires et les acides biliaires sulfatés peuvent provoquer une colite chez la souris. *Faecalibacterium prausnitzii* produit une protéine (*microbial anti-inflammatory molecule*) capable d'inhiber l'activation des voies pro-inflammatoires et de prévenir le développement de la colite chez la souris *5*, ainsi que d'autres métabolites protecteurs dont l'acide salicylique. Les acyl-homoserine lactones, molécules du quorum sensing (dialogue inter-bactérien) communes dans les écosystèmes marins, sont diminuées dans les MICI et ont un effet anti-inflammatoire sur les cellules de la muqueuse

intestinale cultivées *in vitro*. Une étude récente « multi-omics » corrélant la dysbiose aux anomalies métaboliques a permis de confirmer les anomalies sus-citées et met en évidence de façon globale une diminution des métabolites chez les patients atteints de MICI, suggérant une perte de la diversité métabolique chez ces patients *6*.

Aspects thérapeutiques

L'idée de manipuler le microbiote avec l'objectif de restaurer une norrobiose compositionnelle ou fonctionnelle pour contrôler et prévenir l'inflammation intestinale découle naturellement des connaissances acquises sur le microbiote. Les moyens pour y parvenir au-delà des antibiotiques sont l'utilisation de pré- et/ou probiotiques, et, de façon plus pragmatique, la transplantation de microbiote fécal.

Aucun probiotique (substrats de certaines bactéries) n'a montré d'efficacité dans ces maladies. Des probiotiques, micro-organismes vivants, non pathogènes et qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, impactent positivement la santé de l'hôte, ont fait l'objet de essais randomisés. Au cours de la maladie de Crohn, de nombreux essais avec différents probiotiques ont été réalisés sans qu'aucun ait été concluant. En revanche, au cours de la rectocolite hémorragique, une souche spécifique de *E. coli*, la souche Nissle 1917, est aussi efficace que l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA). Traitement de première ligne *7*. Les résultats les plus probants ont été obtenus au cours de la colite, une inflammation du réservoir iléal après coloproctectomie totale pour rectocolite hémorragique. Le VSL#3, mélange de 8 souches bactériennes, a montré son efficacité dans la prévention et dans le maintien en rémission de la colite *8*. L'autre grande voie de manipulation du microbiote intestinal est la transplantation du microbiote fécal. Cette procédure commence à être évaluée dans la rectocolite hémor-

MICROBIOTE INTESTINAL

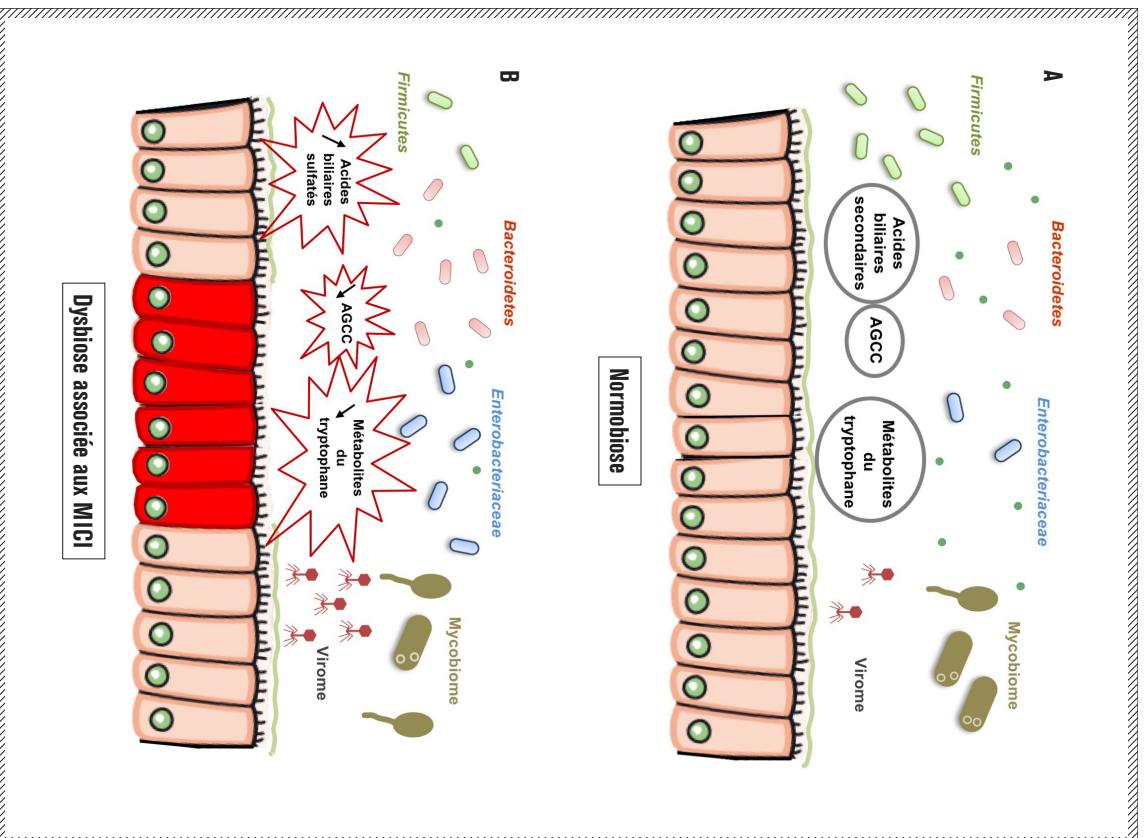


Figure. Déterminants de l'écosystème intestinal en situation saine (A) et au cours des MICI (B). AGCC : acides gras à chaîne courte

MICROBIOTE INTESTINAL

ragique à travers des essais cliniques avec quatre essais randomisés contrôlés dont trois sont positifs.¹¹ Au cours de la maladie de Crohn, les essais sont en cours. La place de la transplantation fécale dans les MICI reste bien sûr à préciser dans les années à venir.

D'autres voies telles que l'utilisation de probiotiques génétiquement modifiés pour la production de métabolites actifs,¹² l'utilisation de phages, de composés actifs issus du microbiote ou de l'hôte (peptides antimicrobiens, acides biliaires, etc.) restent du domaine de la recherche.¹³

VERS UNE MÉDECINE DE PRÉCISION

La dysbiose initialement décrite au cours des MICI correspond à un déséquilibre de l'écosystème entraînant des anomalies dans la composition du microbiote, avec des conséquences fondamentalles sur des mécanismes de symbiose entre le microbiote et l'hôte. Parmi ces modifications de l'écosystème, on retient une diminution globale de métabolites d'origine bactérienne avec en particulier une perte d'éléments protecteurs tels que certains acides biliaires, certains métabolites du tryptophane, ou les acides gras à chaîne courte. L'étude du microbiote au cours des MICI a permis des avancées majeures dans la compréhension de ces maladies et des développements thérapeutiques innovants. La modulation du microbiote est à l'étude au cours des MICI et pourrait rapidement trouver sa place dans les stratégies thérapeutiques. A l'heure de la multidisciplinarité, requise pour la prise en charge des maladies chroniques, l'intégration des données du microbiote intestinal incarne parfaitement la pratique de la médecine moderne et la médecine de précision.¹⁴

RÉSUMÉ QUEL EST LE RÔLE DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LES MICI ?

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) sont des maladies dont l'origine résulte de l'effet combiné de facteurs environnementaux, génétiques et d'une réponse immunitaire de l'hôte altérée à un déséquilibre du microbiote (dysbiose). L'apport des apomorphes de génomique, protéomique, lipidomique et métabolomique a transformé la caractérisation de cette dysbiose, marquée au cours de ces maladies par une altération du microbiote bactérien (diminution des *Firmicutes*, augmentation des *Enterobacteriaceae*) mais aussi du virome et du mycobiome. Cette dysbiose compositionnelle est en fait reliée à une dysbiose fonctionnelle marquée par une diminution de certains métabolites d'origine bactérienne avec, en particulier, une perte d'éléments connus pour être protecteurs tels que certains acides biliaires, certains métabolites du tryptophane ou les acides gras à chaîne courte. Les stratégies thérapeutiques de modulation du microbiote (antibiotiques, probiotiques, prébiotiques et transplantation de microbiote fécal) seront d'abord plus pertinentes que les mécanismes d'action du microbiome seront précisément connus.

SUMMARY WHICH ROLE OF THE GUT MICROBIOME IN IBD?

IBD are inflammatory bowel diseases resulting from the combined effect of environmental and genetic factors and immune responses of the host to an imbalance of the microbiota (dysbiosis). The contribution of genomic, proteomic, lipidomic and metabolomic approaches has changed the characterization of this dysbiosis, marked by an alteration of the bacterial microbiota (decrease in *Firmicutes*, increase in *Enterobacteriaceae*) but also of the gut virome and the gut mycobiome. This compositional dysbiosis is, in fact, a functional dysbiosis showing an overall decrease of bacterial metabolites known to be protective such as some bile acids, some metabolites of tryptophan, or the short-chain fatty acids. The therapeutic strategies aiming to modulate the gut microbiota (antibiotics, probiotics, prebiotics and fecal microbiota transplantation) will be all the more relevant as the mechanisms of action of the microbiome will be better known.

RÉFÉRENCES

1. Daveluie-Michaux A, Boudeau J, Blus P et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with fecal mucus in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:412-21.
2. Savel H, Leclercq V, Aeschard H et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 2017;66:1038-48.
3. Korman JM, Handley SA, Beldridge MT et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Gut* 2015;160:447-60.
4. Quervain E, Maubert MA, Michon C et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient
5. In Crohn's disease. *Gut* 2016;65:415-25.
6. Zuo T, Ng SC. The gut microbiota in the pathogenesis and therapeutics of inflammatory bowel disease. *Front Microbiol* [Internet]. 25 sept. 2018;9. 2242. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.09.0242>
7. Sartor RB, Wu GD. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology* 2017;152:327-39.
8. Dubin H, Rojas S, Ransau D et al. Connecting dysbiosis, the actual dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013;62:531-9.
9. Franca EA, Stride-Mead A, Alia-Farhno J et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol* 2019;4:293-305.
10. Kuo W, Fric P, Poykovec J et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53:1617-23.
11. Tursi A, Brandimonte G, Paola A et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2218-27.
12. Costello SP, Seo W, Bryant RV, Jaroch V, Hart AL, Andrews JM. Systematic review with meta-analysis: basal microbiota transplantation for the induction of remission for active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2017;48:213-24.
13. Aburam BP, Quigley EMM, Donastegar G, Bernstein CN. Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2017;46:769-82.
14. Kwon NC, Forbes JH, Van Donastegar G, Bernstein CN. The gut microbiome as a target for IBD treatment: are we there yet? *Curr Treat Options Gastroenterol* 2019;17:116-26.



Impact of *N*-Acyl-Homoserine Lactones, Quorum Sensing Molecules, on Gut Immunity

Garance Coquant¹, Jean-Pierre Grill¹ and Philippe Seksik^{1,2*}

¹ Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, Hôpital Saint Antoine, Paris, France, ² Department of Gastroenterology, Saint Antoine Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Gislane Lelis Vilela de Oliveira,
São Paulo State University, Brazil

Reviewed by:

Elena Vikström,
Linköping University, Sweden
Anton Hartmann,
Ludwig Maximilian University of
Munich, Germany

*Correspondence:

Philippe Seksik
philippe.seksik@aphp.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Mucosal Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 14 May 2020

Accepted: 08 July 2020

Published: 28 August 2020

Citation:

Coquant G, Grill J-P and Seksik P
(2020) Impact of *N*-Acyl-Homoserine
Lactones, Quorum Sensing
Molecules, on Gut Immunity.
Front. Immunol. 11:1827.
doi: 10.3389/fimmu.2020.01827

Among numerous molecules found in the gut ecosystem, quorum sensing (QS) molecules represent an overlooked part that warrants highlighting. QS relies on the release of small molecules (auto-inducers) by bacteria that accumulate in the environment depending on bacterial cell density. These molecules not only are sensed by the microbial community but also interact with host cells and contribute to gut homeostasis. It therefore appears entirely appropriate to highlight the role of these molecules on the immune system in dysbiosis-associated inflammatory conditions where the bacterial populations are imbalanced. Here, we intent to focus on one of the most studied QS molecule family, namely, the type I auto-inducers represented by *N*-acyl-homoserine lactones (AHL). First described in pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, these molecules have also been found in commensals and have been recently described within the complex microbial communities of the mammalian intestinal tract. In this mini-review, we will expound on this emergent field of research. We will first recall evidence on AHL structure, synthesis, receptors, and functions regarding interbacterial communication. Then, we will discuss their interactions with the host and particularly with agents of the innate and adaptive gut mucosa immunity. This will reveal how this new set of molecules, driven by microbial imbalance, can interact with inflammation pathways and could be a potential target in inflammatory bowel disease (IBD). The discovery of the general impact of these compounds on the detection of the bacterial quorum and on the dynamic and immune responses of eukaryotic cells opens up a new field of pathophysiology.

Keywords: quorum sensing, gut microbiota, interkingdom communication, inflammatory bowel disease, gut inflammation

INTRODUCTION

Dysbiosis in inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by a reduction in bacterial biodiversity. This change in biodiversity is associated with a reduction in the bacterial load of various bacterial groups and expansion of others (1). Bacteria are capable of exchanging small signaling molecules depending on the bacterial density, a process called quorum sensing (QS). QS coordinates gene expression and physiology of bacterial populations. There are several families of molecule used by microbes to communicate. A universal system relying on type II auto-inducers (AI-2) can be used by all bacteria (2). Gram-positive bacteria use oligopeptides, although Gram-negative QS display various molecules (3). Among them, the most studied system is represented by the type I auto-inducers based on *N*-Acyl-homoserines lactones (AHL). Beyond

bacteria–bacteria communication, QS molecules are also involved in interkingdom interplay between gut bacteria and host cells. In the early 2000s, researchers investigated the impact of AHL on plant physiology (4) showing that the presence of these molecules produced by soil bacteria can induce plant benefits (5) such as induction of the immune system to resist pathogens (6, 7). More recently, underlying potential on health and disease, AHL have been described in mammals' gut lumen and lately in humans. It is likely that IBD dysbiosis is a condition that cannot only modify QS but also be maintained by QS. Therefore, a better knowledge of this largely overlooked metabolite component appears important to improve our understanding of the molecular mechanisms implicated in the immune gut responses in IBD.

N-Acyl-Homoserine Lactones Quorum Sensing Molecules for Bacteria

Bacteria are not single cells living independently. They have “social” interactions called QS. QS was first studied in the 1970s through the bioluminescence emitted by a marine bacterium, *Vibrio fischeri*. These bacteria live in symbiosis with marine animals. *V. fischeri* does not emit light at low concentrations in the water; however, when the bacterial population is growing in symbiosis with a squid, within a rich environment, the bacteria emits light (8). This phenomenon is possible, thanks to QS. However, the term was used for the first time two decades later, by Fuqua et al. (9).

This system relies on the release, by bacteria, of small molecules (auto-inducers) that accumulate in the environment depending on bacterial density and are sensed by the bacteria community. Once a threshold concentration is reached, this triggers the expression of certain bacterial genes, encoding for virulence factors, biofilm formation, etc. (Figure 1). Gram-negative bacteria use AHL as one of the QS molecules (10). AHL is a family of molecules composed by a unique lactone ring, an acyl chain of various lengths, and substitutions at the acyl C3 position that define the molecular species. The integrity of the lactone ring is important for AHL immunoactivity (11). Quorum quenching is the mechanisms by which QS signal is degraded, and it can occur enzymatically, through acylases (cleavage of the AHL amid bond, releasing a fatty acid and homoserine lactone) and lactonases (hydrolysis of the HSL ring) (12).

AHL Genes Induction

AHL diffuse freely in bacteria and recognize the receptor LuxR, allowing them to act as a transcription factor. Once activated, QS induces the expression of a series of bacterial genes contributing to bacterial virulence and/or adaptation such

Abbreviations: AHL, N-acyl-homoserine lactones; 3-oxo-C12-HSL, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone; AI, auto-inducer; C4-HSL, N-butyryl-homoserine lactone; DCs, dendritic cells; IBD, inflammatory bowel disease; IFN γ : interferon- γ ; IL-10, interleukine 10; IQGAP1, IQ motif containing GTPase-activating protein 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PON, paraoxonase; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PRR, pattern recognition receptor; QS, quorum sensing; TGF β , transforming growth factor- β ; TLR-2, Toll-like receptor-2; TNF α , tumor necrosis factor- α ; UPR, unfolded protein response.

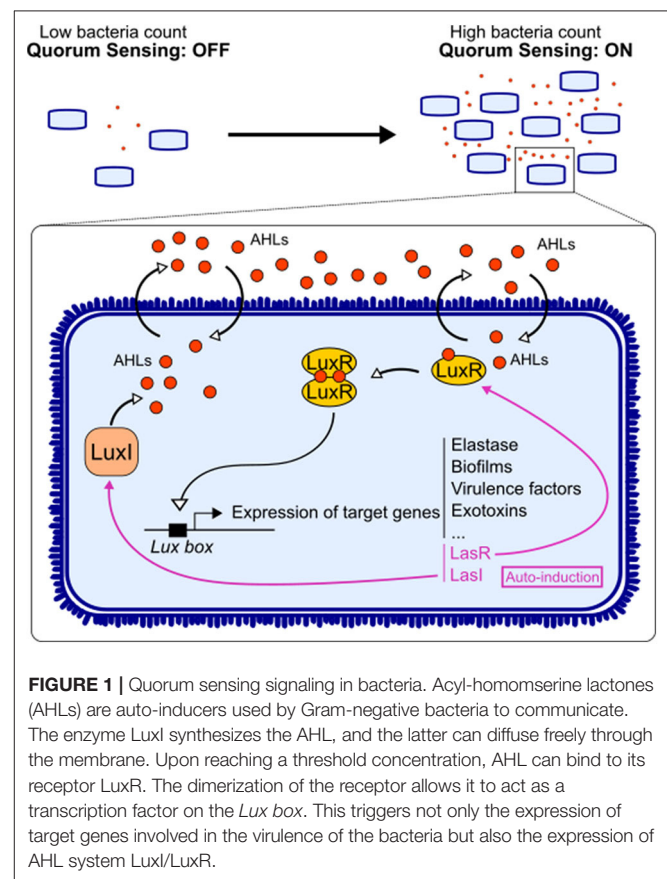


FIGURE 1 | Quorum sensing signaling in bacteria. Acyl-homomserine lactones (AHLs) are auto-inducers used by Gram-negative bacteria to communicate. The enzyme LuxI synthesizes the AHL, and the latter can diffuse freely through the membrane. Upon reaching a threshold concentration, AHL can bind to its receptor LuxR. The dimerization of the receptor allows it to act as a transcription factor on the *Lux box*. This triggers not only the expression of target genes involved in the virulence of the bacteria but also the expression of AHL system LuxI/LuxR.

as toxins, motility, enzymes, secretion systems, iron uptake, metabolism, and biofilms (Figure 1) (3). AHL also regulate their own synthase and receptor genes, in a positive retro-control loop. This system has been mostly described in pathogens, while the impact of these factors on gut immunity has not been directly investigated. However, few reports showed that AHL found in gut ecosystem could benefit host physiology (13). Thus, there is still a gap in research on AHL derived from commensals and their impact on host.

Most studies have focused on the impact of auto-inducers from the opportunistic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) and N-butyryl-homoserine lactone (C4-HSL). Signaling works through the LuxI/LuxR homolog system. LuxI synthesizes the AHL, the molecule freely diffuses in the environment, and LuxR detects the auto-inducer, which acts as a transcription factor (14) (Figure 1). Bacteria can use different ways to communicate: (i) crosstalk, different species talk to each other; (ii) self-talk, bacteria from the same species talk with its own auto-inducer and regulate their gene expression; and (iii) eavesdropping, when bacteria from one species can intercept the signal of another species without creating a signal by itself (15). Indeed, some bacteria express a LuxR homolog without its partner LuxI. LuxR is then labeled LuxR solo, and the receptor is called SdiA (16). For instance, *Escherichia coli* has the SdiA receptor without being

able to produce an auto-inducer (17). This ability to “listen” to other bacterial species is essential in complex ecosystem like the gut microbiota, where hundreds of different bacteria coexist. However, these ways of communicating bypass the bacterial world, and those small molecules are part of an interkingdom signaling, allowing cross-talk between gut microorganisms and the host.

AHL Interkingdom Signaling

Since eukaryotic and prokaryotic cells have coevolved for thousands of years, the signals from one have adapted to the other's. In this setting, bacterial QS molecules have been shown to have an effect on eukaryotic cells, a phenomenon called “interkingdom signaling” (18). To date, most studies on the effects of AHL on mammal cells have focused not only on the well-known 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL from *P. aeruginosa* but also on *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL) from *V. fischeri*. AHL are amphiphilic molecules, as lactone ring remains hydrophilic and the acyl chain is hydrophobic. It has been shown that these properties allow the 3-oxo-C12-HSL to diffuse freely through the cell membrane of eukaryotic cells, similar to bacteria, while long-chained versions are mostly actively transported (19). AHL are chemically analogous to many lipid-based hormones such as the eicosanoid family of lipidic and steroid hormones involved in hundreds of biological functions in eukaryote. It is also thought that AHL can enter the host cell, bind to intracellular receptors, and regulate gene transcription (18). Using labeled molecules, it has been shown that, depending on cell lines, they can indeed enter cells and be detected in the nucleus or the cytoplasm (19, 20).

The AHL perception mechanism in mammalian cells is still fairly unclear. To date, no mammalian receptor has been clearly demonstrated; only certain hypotheses have been proposed. It has been shown that the AHL were not recognized by the classical pattern recognition receptors (PRRs) from the innate immune system like other microbial molecules (21). The studies done on the 3-oxo-C12-HSL produced by *P. aeruginosa* have identified different receptors based on the cell types and methods used. Proinflammatory effects have been associated with receptors such as nuclear factor kappa B (NF- κ B) or activator protein-2 (AP-2) (21). Using other cellular models, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have been proposed as potential receptors (22). In 2008, Jahoor et al. identified the peroxisome proliferator-activated (PPAR) receptors PPAR β / δ and PPAR γ as potential AHL receptors (23). The interaction between 3-oxo-C12-HSL and PPAR γ has also been reported by another group, at very low concentration (1 nM) of AHL (24).

Other candidate mammalian AHL receptors are the G-protein-coupled receptors and, among these, member 38 of the bitter taste receptor family (T2R38), one of the most studied bitter taste receptors. It is widely expressed in the human digestive tract from the tongue to the colon (25). In the lower gastrointestinal tract, T2R38 is suspected to play a role in eliciting immune responses to toxic compounds or pathogens in digestive diseases and metabolic conditions. Indeed, *TAS2R38* polymorphisms have been linked to increased

susceptibility to infections and colorectal cancer (26–28). Moreover, reports shows that both 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL can activate T2R38 in pulmonary epithelium (28). The interaction between AHL and this receptor was described in neutrophils, by immunofluorescence and pull-down assays (29, 30).

Another potential AHL receptor is the IQ-motif-containing GTPase-activating protein (IQGAP1) (31). IQGAP1 is a scaffolding protein, participating in cytoskeleton organization (32). It has been shown that IQGAP1 plays a role in tight junction assembly (32), and as 3-oxo-C12-HSL is known to disrupt junction integrity (10), the interaction between IQGAP1 and AHL seems rational.

Finally, according to the cell type, the receptors and their localization can be different (33, 34) but mainly involves inflammatory pathways. Host cells have developed the abilities to disrupt QS signaling, by degrading them through the production of paraoxonases (PON), which can be expressed by intestinal epithelial cells and macrophages (35). Regulation of this communication between host cells and bacteria can occur in gut ecosystem. Moreover, it has been shown that PON1 polymorphisms may confer protection against the development of IBD (36). Therefore, AHL interkingdom signaling can be viewed as potent axis of the gut microbiota–host crosstalk in chronic inflammation and especially in IBD.

Impact of AHL on Innate Immunity

It has been shown, on cell lines and primary cell cultures, that AHL, depending on their acyl chain length, double bounds, and concentrations, may differently affect innate immune system.

Epithelial cells provide a physical barrier between the host and the lumen of the intestine, relying on tight junctions. This prevents the luminal content to harm the host's integrity. Epithelial cells contribute to the innate immune response, as they keep foreign particles from spreading into the host mucosa. Vikström et al. showed, on an intestinal epithelial cell line Caco-2, that *P. aeruginosa* 3-oxo-C12-HSL alters intestinal barrier, disrupting protein junctions integrity (37–40). When exposed to the AHL, permeability to macromolecules and ions is increased, and the expression and localization of junction proteins such as occludin, E-cadherin, and zonula occludens-1 is modified (37–39). This alteration process not only involves the MAPK, notably p38 and p42/44, but also needs the phosphorylation of junction proteins leading to disturbance of junction integrity (37–39). Alteration of calcium signaling is also part of the response to 3-oxo-C12-HSL (39, 41). Interestingly, C4-HSL does not disturb barrier integrity like 3-oxo-C12-HSL (40). Moreover, an AHL identified recently in the gut, 3-oxo-C12:2-HSL, exerts anti-inflammatory effects on Caco-2/TC7 cell line stimulated by interleukine-1 β (IL-1 β), as shown on IL-8-reduced secretion (13).

Some groups identified AHL as chemoattractant to neutrophils, as it is the case for 3-oxo-C12-HSL and 3-oxo-C10-HSL, but not C4-HSL. AHL attract neutrophils in a dose-dependent fashion, through actin remodeling and

calcium mobilization (42, 43). Moreover, 3-oxo-C12-HSL exerts proapoptotic function on neutrophils, by targeting mitochondria and their calcium balance (43).

Macrophages are one of the most studied cell type regarding 3-oxo-C12-HSL impacts. Overall, the observed effects aim at decreasing the inflammatory response, allowing the set-up of a chronic *P. aeruginosa* infection. The effects are various, from cell-volume increase through water flux (44), unfold protein response (UPR) (45) to apoptosis (46) and also on immune functions. Indeed, *P. aeruginosa* 3-oxo-C12-HSL exerts anti-inflammatory responses in macrophages, as was reported by Glucksam-Galnoy et al. on RAW264.7 murine macrophages, in a dose-dependent fashion. Notably, a decrease in tumor necrosis factor- α production and increase in IL-10 secretion was observed (47). As mentioned earlier, when macrophages are in a proinflammatory context, 3-oxo-C12-HSL can modulate the NF- κ B pathway resulting in a decrease in the expression of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF α), regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted (RANTES), or monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (48). The involvement of MAPK p38 has also been reported several times (21, 47, 49) but needs further studies to determine its role in the signaling. In addition, it has been shown that macrophages in the presence of 3-oxo-C12-HSL have a higher phagocytic activity (49, 50), and those effects are abolished when MAPK p38 is inhibited (49).

Dendritic cells (DCs) stimulated by lipopolysaccharides and in the presence of 3-oxo-C12-HSL show a decrease in their proinflammatory cytokine such as IL-12 and interferon- γ (IFN γ) (51–53). However, reports on anti-inflammatory IL-10 are contradictory. In both studies, the cells were stimulated by lipopolysaccharides and exposed to the same dose of 3-oxo-C12-HSL; one team reported an increase in IL-10 secretion by human DCs (53), while another group did not see any change in IL-10 production by mouse DCs (52). By modulating DCs activation through its QS molecules, *P. aeruginosa* suppress the adaptive immune response, favoring the establishment of chronic infection (52, 53). 3-oxo-C12-HSL has also proapoptotic effects on humans DCs, as is the case for several cell types (54).

AHL have cell-type-specific impacts, but overall, the effects tend to be anti-inflammatory. Besides, 3-oxo-C12-HSL effects on apoptosis are dependent on the cell types, as multiple studies do not report toxicity on differentiated epithelial cells or fibroblasts (31, 55, 56). The effects of 3-oxo-C12-HSL on immune cells are compiled in the **Table S1**. These pathogen-related AHL also display multiple disruptions on several cell functions from innate immune cells.

Impact of AHL on Adaptive Immunity

Once again, most of the knowledge in that field relies on 3-oxo-C12-HSL from *P. aeruginosa*. It had been first shown that this AHL could inhibit T-cell proliferation (57). This was confirmed by later reports showing that the same AHL could inhibit the proliferation and function (cytokine production)

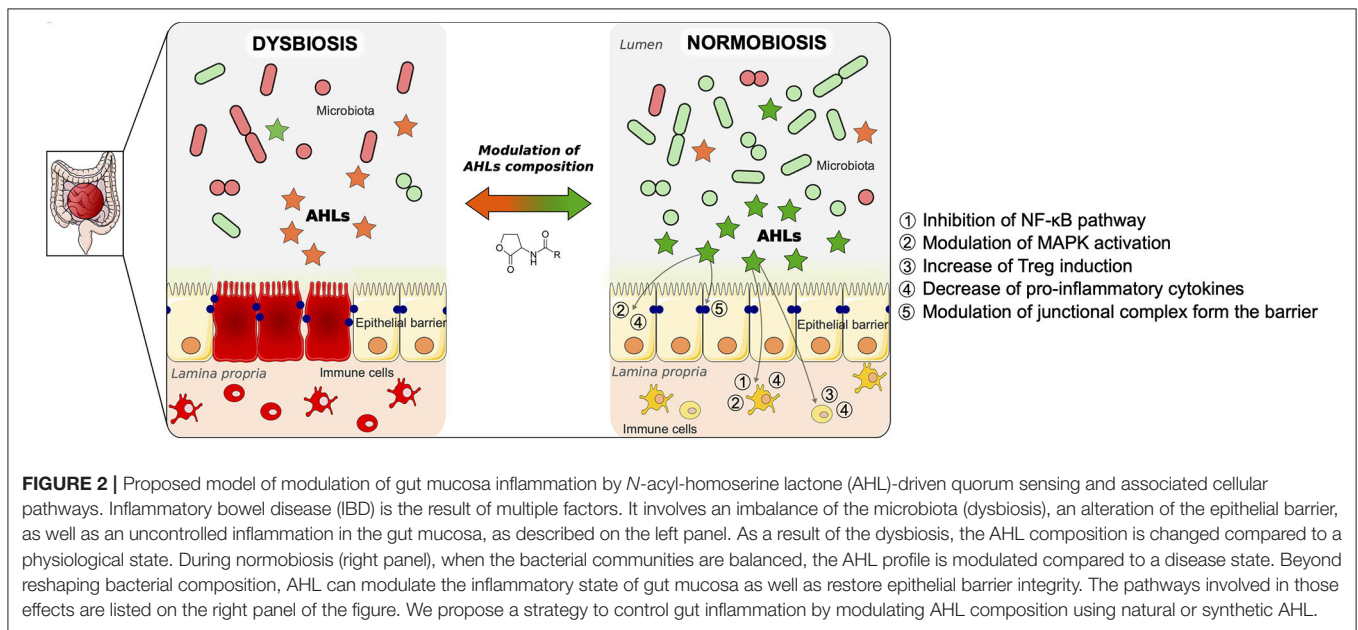
of both mitogen-stimulated (11, 58) and antigen-stimulated (59) T lymphocytes and modulate antibody production by B lymphocytes (57, 58). Overall, AHL from *P. aeruginosa* tend to have a less effective antibody-mediated, rather than a more effective cell-mediated, adaptive immune response to the bacteria, and could thus facilitate persistence of the pathogen. A structure–activity relationship study of 3-oxo-C12-HSL indicated that, like QS activity, immune modulatory activity requires an intact HSL ring, L-configuration at the chiral center, and an acyl chain of 11–13 carbons (11). Moreover, 3-oxo-C12-HSL can rapidly induce apoptosis via mitochondrial pathway on Jurkat cell line (60) and can inhibit DCs and T-cell activation and proliferation, and downregulate the expression of costimulatory molecules on DCs (54, 61, 62). This results in shifting immune responses away from host-protective Th1 responses to pathogen-protective Th2 responses (62). More precisely, 3-oxo-C12-HSL is able to promote the induction of regulatory T cells such as CD4+CD25+Foxp3+ induced regulatory T cells and to enhance their IL-10 and transforming growth factor- β (TGF β) production associated with reduced IFN γ and IL-12p70 production (53). At the molecular level, 3-oxo-C12-HSL prevents human DCs maturation by blocking the upregulation of surface molecules, including CD11c, HLA-DR, CD40, and CD80, and DCs switched to an interleukin IL-10 (high), IL-12p70 (low) phenotype (53).

In addition, it has been reported that 3-oxo-C12-HSL increases the expression of Toll-like receptor-2 (TLR2), in a dose-dependent fashion, in lymphocytes from peripheral blood (63). Those observations are interesting because it has been shown that this AHL signaling does not rely on TLR recognition (21).

Taking together, there are limited observations showing T-cell inhibition and Treg induction by one AHL from a pathogen. It is crucial to look at the effect of other natural AHL especially those coming from commensal gut bacteria.

AHL Within Intestinal Communities Clues on the Presence of AHL in the Gut

The existence of AHL in the gut has been subject to questioning. An article from 2013 entitled “Are There Acyl-Homoserine Lactones within Mammalian Intestines?” examine the question (64). Mammalian pathogens such as *P. aeruginosa* or *Yersinia enterocolitica* are well known for their ability to produce AHL, but what about commensal bacteria? As mentioned by the authors, previous studies relied on the use of LuxR-based biosensors, where the detection limit may be too high to detect AHL from the gut, and there is thus a need for the development of new more sensitive tools (64). Moreover, the Human Microbiome Project, aiming at sequencing and analyzing the microbiome of several cohorts, gives clues about the presence of AHL in the intestines. Indeed, the LuxI/LuxR homolog has been found in three strains from the gastrointestinal tract: *Hafnia alvei*, *Edwardsiella tarda*, and *Ralstonia* sp. strain 5_7_47FAA (64). In addition, bacteria like *E. coli*, *Enterobacter*, or *Klebsiella* are part of the normal gut microbiota and express, as mentioned above, the receptor SdiA and therefore can sense AHL (17). One must highlight the fragility of small molecules like AHL. Indeed, they are pH sensitive and can also be inactivated by the



presence of not only host lactonases like PON but also bacterial enzymes. Those degradations can decrease the concentration of the molecules, making it harder for biosensors to reach the threshold detection (64). Moreover, it is also possible that auto-inducers are present in the mammalian gut, but with a yet unknown structure, like aryl-homoserine lactones, with an aromatic side chain instead of an acyl chain and thus not detectable by biosensors (64). It is also interesting to note that AHL have been found in the rumen of cattle by several teams (65, 66).

Our team investigated the question of AHL in the human gut, in the context of IBD. By using mass spectrometry, we were able to detect 14 different AHLs in the feces of IBD patients and healthy subject, and the distribution of the AHL were correlated to the disease state (13). Indeed, one of the AHL was prominent: 3-oxo-C12:2-HSL. This molecule was, until then, undescribed and carries two insaturations on its acyl chain. 3-Oxo-C12:2-HSL was highly decreased in fecal samples of IBD patients in flare (16%) compared to remission patients (37.5%) and to healthy subjects (64.5%) (13). The absence of this AHL was correlated with dysbiosis and a decrease in Firmicutes, considered as beneficial bacteria. In addition, 3-oxo-C12:2-HSL exerts anti-inflammatory properties on intestinal cell lines Caco-2/TC7 (13).

Toward the Use of AHL to Modulate Microbiota Composition and Gut Inflammation

The study of QS molecules is mainly done on single species bacteria or *in vitro* cells. As emphasized by Karina Bivar Xavier, QS is also an interspecies communication network, and more studies on the impact of QS on multi-communities ecosystems should be done (67). *In vivo* studies are crucial to understanding relationships in an environment as complex as the intestine. Kumari et al. have developed a whole-cell

sensing systems for the detection of AHL and have shown that these signaling molecules detected in saliva and stool may be potential non-invasive biomarkers of gastrointestinal inflammatory disease (68). To emphasize this point, given that AHL profile relies on bacterial dynamics, it could be considered as an indicator of dysbiosis, opening new perspectives in managing chronic diseases such as IBD. Understanding the interactions between bacteria in high concentrations and high diversity can help us decipher what species are most beneficial to mammalian gut. To note, another QS type of molecule, AI-2, has been used to modulate gut microbiota composition and dysbiosis (69). As illustrated in **Figure 2**, AHLs remain good candidates in the strategy to use natural molecules from QS to modulate microbiota composition and gut inflammation.

CONCLUDING REMARKS

Gut microbiota mutually interacts with coevolved host epithelial and immune cells in a beneficial reciprocal relationship. QS signaling of bacteria probably contributes substantially to establishing symbiotic interactions in some cross-kingdom interactive dynamics. In IBD, where, host-microbiota interactions drive inflammatory response, looking at quorum sensing changes and impact on immunity appears as a completely novel and original approach. The mechanisms, including the regulation of synthesis and degradation of these diffusible signaling molecules are still not completely understood. However, the discovery of the general importance of auto-inducer signaling molecules involved in quorum or efficiency sensing of bacteria and the dynamic and immune responses by eukaryotes toward them opens up a new field of pathophysiology.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GC and PS drew the outline of the manuscript. GC, J-PG, and PS wrote and proofread the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

We disclose Financial support from Fondation pour la Recherche Médicale that ensures salary fees of GC as a PhD student.

REFERENCES

- Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. (2011) 474:298–306. doi: 10.1038/nature10208
- Bassler BL, Wright M, Silverman MR. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol*. (1994) 13:273–86. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00422.x
- Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *mBio*. (2018) 9:14. doi: 10.1128/mBio.02331-17
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG, et al. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2003) 100:1444–9. doi: 10.1073/pnas.262672599
- Schikora A, Schenk ST, Hartmann A. Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group. *Plant Mol Biol*. (2016) 90:605–12. doi: 10.1007/s11103-016-0457-8
- Liu F, Zhao Q, Jia Z, Song C, Huang Y, Ma H, et al. N-3-oxo-octanoyl-homoserine lactone-mediated priming of resistance to *Pseudomonas syringae* requires the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*. (2020) 20:38. doi: 10.21203/rs.2.11827/v2
- Hu Z, Shao S, Zheng C, Sun Z, Shi J, Yu J, et al. Induction of systemic resistance in tomato against *Botrytis cinerea* by N-decanoyl-homoserine lactone via jasmonic acid signaling. *Planta*. (2018) 247:1217–27. doi: 10.1007/s00425-018-2860-7
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system1. *J Bacteriol*. (1970) 104:313–22. doi: 10.1128/JB.104.1.313-322.1970
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. (1994) 176:269–75. doi: 10.1128/JB.176.2.269-275.1994
- Holm A, Vikström E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front Plant Sci*. (2014) 5:309. doi: 10.3389/fpls.2014.00309
- Chhabra SR, Harty C, Hooi DSW, Daykin M, Williams P, Telford G, et al. Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *J Med Chem*. (2003) 46:97–104. doi: 10.1021/jm020909n
- Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*. (2017) 551:313–20. doi: 10.1038/nature24624
- Landman C, Grill J-P, Mallet J-M, Marteau P, Humbert L, Balch EL, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0202587
- Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1999) 96:4360–5. doi: 10.1073/pnas.96.8.4360
- Prescott RD, Decho AW. Flexibility and adaptability of quorum sensing in nature. *Trends Microbiol*. (2020) 28:436–44. doi: 10.1016/j.tim.2019.12.004
- Hudaiberdiev S, Choudhary KS, Vera Alvarez R, Gelencsér Z, Ligeti B, Lamba D, et al. Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. *Front Cell Infect Microbiol*. (2015) 5:20. doi: 10.3389/fcimb.2015.00020
- Tobias NJ, Brehm J, Kresovic D, Brameyer S, Bode HB, Heermann R. New vocabulary for bacterial communication. *ChemBioChem*. (2020) 21:759–68. doi: 10.1002/cbic.201900580
- Shiner EK, Rumbaugh KP, Williams SC. Interkingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev*. (2005) 29:935–47. doi: 10.1016/j.femsre.2005.03.001
- Ritchie AJ, Whittall C, Lazenby JJ, Chhabra SR, Pritchard DI, Cooley MA. The immunomodulatory *Pseudomonas aeruginosa* signalling molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone enters mammalian cells in an unregulated fashion. *Immunol Cell Biol*. (2007) 85:596–602. doi: 10.1038/sj.icb.7100090
- Williams P, Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol*. (2009) 12:182–91. doi: 10.1016/j.mib.2009.01.005
- Kravchenko VV, Kaufmann GF, Mathison JC, Scott DA, Katz AZ, Wood MR, et al. N-(3-Oxo-acyl)homoserine lactones signal cell activation through a mechanism distinct from the canonical pathogen-associated molecular pattern recognition receptor pathways. *J Biol Chem*. (2006) 281:28822–30. doi: 10.1074/jbc.M606613200
- Li L, Hooi D, Chhabra SR, Pritchard D, Shaw PE. Bacterial N-acylhomoserine lactone-induced apoptosis in breast carcinoma cells correlated with down-modulation of STAT3. *Oncogene*. (2004) 23:4894–902. doi: 10.1038/sj.onc.1207612
- 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. doi: 10.1128/JB.01444-07
- Cooley MA, Whittall C, Rolph MS. *Pseudomonas* signal molecule 3-oxo-C12-homoserine lactone interferes with binding of rosiglitazone to human PPAR γ . *Microbes Infect*. (2010) 12:231–7. doi: 10.1016/j.micinf.2009.12.009
- Behrens M, Meyerhof W. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiol Behav*. (2011) 105:4–13. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.02.010
- Rozenburg E. Taste receptors in the gastrointestinal tract. I. Bitter taste receptors and alpha-gustducin in the mammalian gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. (2006) 291:G171–7. doi: 10.1152/ajpgi.00073.2006
- Carrai M, Steinke V, Vodicka P, Pardini B, Rahner N, Holinski-Feder E, et al. Association between TAS2R38 gene polymorphisms and colorectal cancer risk: a case-control study in two independent populations of Caucasian origin. *PLoS ONE*. (2011) 6:e20464. doi: 10.1371/journal.pone.0020464
- Lee RJ, Xiong G, Kofonow JM, Chen B, Lysenko A, Jiang P, et al. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J Clin Invest*. (2012) 122:4145–59. doi: 10.1172/JCI64240
- Gaida MM, Mayer C, Dapunt U, Stegmaier S, Schirmacher P, Wabnitz GH, et al. Expression of the bitter receptor T2R38 in pancreatic cancer: localization in lipid droplets and activation by a bacteria-derived quorum-sensing molecule. *Oncotarget*. (2016) 7:12623–32. doi: 10.18632/oncotarget.7206
- Maurer S, Wabnitz GH, Kahle NA, Stegmaier S, Prior B, Giese T, et al. Tasting *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: human neutrophils express the

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ilias Theodorou, PhD, for his careful proofreading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01827/full#supplementary-material>

- bitter receptor T2R38 as sensor for the quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Front Immunol.* (2015) 6:369. doi: 10.3389/fimmu.2015.00369
31. Karlsson T, Turkina MV, Yakymenko O, Magnusson K-E, Vikström E. The *Pseudomonas aeruginosa* N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration. *PLoS Pathog.* (2012) 8:e1002953. doi: 10.1371/journal.ppat.1002953
 32. Tanos BE, Yeaman C, Rodriguez-Boulan E. An emerging role for IQGAP1 in tight junction control. *Small GTPases.* (2018) 9:375–83. doi: 10.1080/21541248.2016.1244440
 33. Bedi B, Maurice NM, Ciavatta VT, Lynn KS, Yuan Z, Molina SA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists attenuate biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *FASEB J.* (2017) 31:3608–21. doi: 10.1096/fj.201700075R
 34. Cohen LJ, Esterhazy D, Kim S-H, Lemetre C, Aguilar RR, Gordon EA, et al. Commensal bacteria make GPCR ligands that mimic human signalling molecules. *Nature.* (2017) 549:48–53. doi: 10.1038/nature23874
 35. Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev.* (2016) 40:86–116. doi: 10.1093/femsre/fuv038
 36. Karban A, Hartman K, Eliakim R, Waterman M, Neshet S, Barnett-Griness O, et al. Paraoxonase (PON)1 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* (2007) 52:2707–15. doi: 10.1007/s10620-006-9700-5
 37. Vikström E, Tafazolli F, Magnusson K-E. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS Lett.* (2006) 580:6921–8. doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.057
 38. Vikström E, Bui L, Konradsson P, Magnusson K-E. The junctional integrity of epithelial cells is modulated by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms. *Exp Cell Res.* (2009) 315:313–26. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.10.044
 39. Vikström 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. *Eur J Cell Biol.* (2010) 89:584–97. doi: 10.1016/j.jecb.2010.03.002
 40. 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. *AJP Gastrointest Liver Physiol.* (2014) 306:G992–1001. doi: 10.1152/ajpgi.00016.2014
 41. Schwarzer C, Wong S, Shi J, Matthes E, Illek B, Ianowski JP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* homoserine lactone activates store-operated cAMP and cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent Cl^- secretion by human airway epithelia. *J Biol Chem.* (2010) 285:34850–63. doi: 10.1074/jbc.M110.167668
 42. Karlsson T, Musse F, Magnusson K-E, Vikström E. N-Acylhomoserine lactones are potent neutrophil chemoattractants that act via calcium mobilization and actin remodeling. *J Leukoc Biol.* (2012) 91:15–26. doi: 10.1189/jlb.0111034
 43. Singh PK, Yadav VK, Kalia M, Sharma D, Pandey D, Agarwal V. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in neutrophils through calcium signaling. *Med Microbiol Immunol.* (2019) 208:855–68. doi: 10.1007/s00430-019-00631-8
 44. Holm A, Magnusson K-E, Vikström E. *Pseudomonas aeruginosa* N-3-oxododecanoyl-homoserine lactone elicits changes in cell volume, morphology, and AQP9 characteristics in macrophages. *Front Cell Infect Microbiol.* (2016) 6:32. doi: 10.3389/fcimb.2016.00032
 45. Zhang J, Gong F, Li L, Zhao M, Song J. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by activating the unfolded protein response. *Biomed Rep.* (2014) 2:233–8. doi: 10.3892/br.2014.225
 46. Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun.* (2003) 71:5785–93. doi: 10.1128/IAI.71.10.5785-5793.2003
 47. Glucksam-Galnoy Y, Sananes R, Silberstein N, Krief P, Kravchenko VV, Meijler MM, et al. The bacterial quorum-sensing signal molecule N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone reciprocally modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in activated macrophages. *J Immunol.* (2013) 191:337–44. doi: 10.4049/jimmunol.1300368
 48. Kravchenko VV, Kaufmann GF, Mathison JC, Scott DA, Katz AZ, Grauer DC, et al. Modulation of gene expression via disruption of NF- κ B signaling by a bacterial small molecule. *Science.* (2008) 321:259–63. doi: 10.1126/science.1156499
 49. Vikström E, Magnusson K-E, Pivoriunas A. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone stimulates phagocytic activity in human macrophages through the p38 MAPK pathway. *Microbes Infect.* (2005) 7:1512–8. doi: 10.1016/j.micinf.2005.05.012
 50. Holm A, Karlsson T, Vikström E. *Pseudomonas aeruginosa* lasI/rhlI quorum sensing genes promote phagocytosis and aquaporin 9 redistribution to the leading and trailing regions in macrophages. *Front Microbiol.* (2015) 6:915. doi: 10.3389/fmicb.2015.00915
 51. Guo J, Yoshida K, Ikegame M, Okamura H. Quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone: an all-rounder in mammalian cell modification. *J Oral Biosci.* (2020) 62:16–29. doi: 10.1016/j.job.2020.01.001
 52. Skindersoe ME, Zeuthen LH, Brix S, Fink LN, Lazenby J, Whittall C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (2009) 55:335–45. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00533.x
 53. Li Y, Zhou H, Zhang Y, Chen C, Huang B, Qu P, et al. N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone promotes the induction of regulatory T-cells by preventing human dendritic cell maturation. *Exp Biol Med.* (2015) 240:896–903. doi: 10.1177/1535370214564742
 54. Boontham P, Robins A, Chandran P, Pritchard D, Cámara M, Williams P, et al. Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clin Sci.* (2008) 115:343–51. doi: 10.1042/CS20080018
 55. Josephson H, Ntzouni M, Skoglund C, Linder S, Turkina MV, Vikström E. *Pseudomonas aeruginosa* N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone impacts mitochondrial networks morphology, energetics, and proteome in host cells. *Front Microbiol.* (2020) 11:1069. doi: 10.3389/fmicb.2020.01069
 56. Losa D, Köhler T, Bacchetta M, Saab JB, Frieden M, van Delden C, et al. Airway epithelial cell integrity protects from cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signals. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2015) 53:265–75. doi: 10.1165/rcmb.2014-0405OC
 57. Telford G, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT, Appleby P, Sewell H, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun.* (1998) 66:36–42. doi: 10.1128/IAI.66.1.36-42.1998
 58. Ritchie AJ, Yam AOW, Tanabe KM, Rice SA, Cooley MA. Modification of *in vivo* and *in vitro* T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun.* (2003) 71:4421–31. doi: 10.1128/IAI.71.8.4421-4431.2003
 59. Ritchie AJ, Jansson A, Stallberg J, Nilsson P, Lysaght P, Cooley MA. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect Immun.* (2005) 73:1648–55. doi: 10.1128/IAI.73.3.1648-1655.2005
 60. Jacobi CA, Schiffner F, Henkel N, Waibel M, Stork B, Daubrawa M, et al. Effects of bacterial N-acyl homoserine lactones on human Jurkat T lymphocytes-OdDHL induces apoptosis via the mitochondrial pathway. *Int J Med Microbiol.* (2009) 299:509–19. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.03.005
 61. Hooi DSW, Bycroft BW, Chhabra SR, Williams P, Pritchard DI. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infect Immun.* (2004) 72:6463–70. doi: 10.1128/IAI.72.11.6463-6470.2004
 62. Gupta RK, Chhibber S, Harjai K. Acyl homoserine lactones from culture supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* accelerate host immunomodulation. *PLoS ONE.* (2011) 6:e20860. doi: 10.1371/journal.pone.0020860
 63. Bao L, Yu J, Zhong H, Huang D, Lu Q. Expression of toll-like receptors in T lymphocytes stimulated with N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS.* (2017) 125:553–7. doi: 10.1111/apm.12690

64. Swearingen MC, Sabag-Daigle A, Ahmer BMM. Are there acyl-homoserine lactones within mammalian intestines? *J Bacteriol.* (2013) 195:173–9. doi: 10.1128/JB.01341-12
65. Erickson DL, Nsereko VL, Morgavi DP, Selinger LB, Rode LM, Beauchemin KA. Evidence of quorum sensing in the rumen ecosystem: detection of N - acyl homoserine lactone autoinducers in ruminal contents. *Can J Microbiol.* (2002) 48:374–8. doi: 10.1139/w02-022
66. Won M-Y, Oyama LB, Courtney SJ, Creevey CJ, Huws SA. Can rumen bacteria communicate to each other? *Microbiome.* (2020) 8:23. doi: 10.1186/s40168-020-00796-y
67. Bivar Xavier K. Bacterial interspecies quorum sensing in the mammalian gut microbiota. *C R Biol.* (2018) 341:297–9. doi: 10.1016/j.crvi.2018.03.006
68. Kumari A, Pasini P, Deo SK, Flomenhoft D, Shashidhar H, Daunert S. Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules. *Anal Chem.* (2006) 78:7603–9. doi: 10.1021/ac061421n
69. Thompson JA, Oliveira RA, Djukovic A, Ubeda C, Xavier KB. Manipulation of the quorum sensing signal AI-2 affects the antibiotic-treated gut microbiota. *Cell Rep.* (2015) 10:1861–71. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.049

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Coquant, Grill and Seksik. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Article

Anti-Inflammatory Effects of Analogues of *N*-Acyl Homoserine Lactones on Eukaryotic Cells

Agathe Peyrottes ^{1,2}, Garance Coquant ², Loïc Brot ² , Dominique Rainteau ²,
Philippe Seksik ^{2,3,*} , Jean-Pierre Grill ² and Jean-Maurice Mallet ¹

¹ Laboratoire des Biomolécules (LBM), Département de chimie, École Normale Supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France; agathepeyrottes@gmail.com (A.P.); Jean-Maurice.Mallet@ens.fr (J.-M.M.)

² INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Microbiote Intestin et Inflammation, Sorbonne Université, 75005 Paris, France; garance.coquant@gmail.com (G.C.); loic.brot@sorbonne-universite.fr (L.B.); dominique.rainteau@sorbonne-universite.fr (D.R.); jean-pierre.grill@upmc.fr (J.-P.G.)

³ Service de Gastroentérologie et Nutrition, Hôpital Saint-Antoine, APHP, 75012 Paris, France

* Correspondence: philippe.seksik@sat.aphp.fr; Tel.: +33-1492-83162; Fax: +33-1492-83188

Received: 13 November 2020; Accepted: 7 December 2020; Published: 11 December 2020



Abstract: Background: Since acyl-homoserine lactone (AHL) profiling has been described in the gut of healthy subjects and patients with inflammatory bowel disease (IBD), the potential effects of these molecules on host cells have raised interest in the medical community. In particular, natural AHLs such as the 3-oxo-C12-HSL exhibit anti-inflammatory properties. Our study aimed at finding stable 3-oxo-C12-HSL-derived analogues with improved anti-inflammatory effects on epithelial and immune cells. Methods: We first studied the stability and biological properties of the natural 3-oxo-C12-HSL on eukaryotic cells and a bacterial reporter strain. We then constructed and screened a library of 22 AHL-derived molecules. Anti-inflammatory effects were assessed by cytokine release in an epithelial cell model, Caco-2, and a murine macrophage cell line, RAW264.7, (respectively, IL-8 and IL-6) upon exposure to the molecule and after appropriate stimulation (respectively, TNF- α 50 ng/mL and IFN- γ 50 ng/mL, and LPS 10 ng/mL and IFN- γ 20 U/mL). Results: We found two molecules of interest with amplified anti-inflammatory effects on mammalian cells without bacterial-activating properties in the reporter strain. The molecules furthermore showed improved stability in biological medium compared to the native 3-oxo-C12-HSL. Conclusions: We provide new bio-inspired AHL analogues with strong anti-inflammatory properties that will need further study from a therapeutic perspective.

Keywords: AHL; inflammatory bowel disease; gut microbiota

1. Introduction

The gastrointestinal tract is a complex milieu in which host epithelial and immune cells coexist with a wide array of microorganisms, namely gut microbiota and food antigens. The gut microbiota is composed of trillions of bacteria (10^{13} bacteria) that collectively play major roles in human physiology, being notably involved in the intestinal barrier and immune system maturation [1]. Gut microbiota metabolites such as short-chain fatty acids, bile acids, and tryptophan metabolites are the main known drivers of the impact of gut microbiota on hosts [2]. Manipulating gut microbiota, and especially microbiota derived metabolites, to influence host physiology remains therefore a major challenge in an increasing number of human diseases. This approach seems perfectly suited in inflammatory bowel diseases (IBD) where dysbiosis (imbalance in gut microbiota) and inflammation are seen [3]. A largely

overlooked component of gut microbiota is that of diffusible signal molecules, which are known to modulate the physiological response in human cells. A particular class of these signaling compounds is represented by bacterial quorum sensing (QS) molecules and particularly *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs).

Because eukaryotic and prokaryotic cells have co-existed and co-evolved together, they have adapted to the signal molecules secreted by one another. AHLs are known to influence gene expression and certain behaviors in eukaryotes, a phenomenon called interkingdom signaling [4–6]. To date, most studies on the effects of AHLs on mammal cells have focused on the well-known molecules 3-oxo-C12-HSL (1) and C4-HSL from the pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, and 3-oxo-C6-HSL from *Vibrio fischeri* for medical and historic reasons [7–10]. AHLs have been described to enter human cells, where they can exert various effects ranging from apoptosis induction to immune and inflammation modulation [7,8,11–13]. Not only can AHLs recruit specific cell types, but they also modulate the cytokine secretion in vitro at both the RNA and protein levels [14]. AHL effects have been described to date on very diverse cell types, from breast cancer to immune cells, but also lung epithelium, and more recently on intestinal epithelial cells [14–16].

Indeed, QS driven by AHLs has been described in many bacterial ecosystems, but it has not been well studied in the human intestinal microbiota. We published the first detection by LC-MS/MS of AHLs from the human gut, and profiled AHLs distribution over a cohort of healthy individuals and IBD patients [17]. This led to the identification of the most conserved, abundant, and never-described AHL associated to the healthy human gut: It is a doubly unsaturated AHL of formula 3-oxo-C12:2-HSL (2) [17]. Unsaturated AHLs are not commonly found in bacteria, which favor saturated molecules [18]. To date, only the marine *Roseobacter* clade is a well-known producer of mono- and di-unsaturated AHLs, with carbon chains ranging from 10 to 18 atoms [19–21]. However, none of these molecules carry a ketone [19–21]. Hence, the discovery of new active forms of AHLs questions the tight relationship between their chemical structure and their bioactivity in both mammals and bacteria. In fact, rates of 3-oxo-C12:2-HSL in feces of individuals negatively correlates with IBD status: healthy controls and patients in remission exhibited high levels of the molecule, while patients with active disease showed no or little amounts of this molecule [17]. This led to the hypothesis of an anti-inflammatory effect of the 3-oxo-C12:2-HSL. We were able to show a modest anti-inflammatory effect of 3-oxo-C12:2-HSL on epithelial cells [17].

In order to enhance this effect, we searched for more powerful and more stable molecules. Using the natural AHL 3-oxo-C12-HSL as a template, we here report the development of several AHL analogues. The newly designed molecules were then screened for bioactivity on both mammalian cell lines and bacterial reporter strains.

2. Results

2.1. The Natural AHL 3-Oxo-C12-HSL Exerts Modest Anti-Inflammatory Effects on Gut Barrier Eukaryotic Cells

2.1.1. AHL 3-Oxo-C12-HSL Exerts Anti-Inflammatory Effects on Epithelial Cells

Non stimulated Caco-2/TC7 cells exposed with increasing doses of 3-oxo-C12-HSL did not show significant change in interleukine-8 (IL-8) secretion. When epithelial cells were stimulated with IL-1 β , we observed a significant decrease in IL-8 secretion in the presence of 5 μ M 3-oxo-C12-HSL, compared to that of the control DMSO (Figure 1a). There was a bell-shaped activity curve, with significant decreases of IL-8 secretion at low concentrations (range 1–10 μ M), while the effects were abolished at higher concentrations (over 50 μ M). The maximum magnitude was reached with a dose of 5 μ M, where a reduction of 27.6% of secreted IL-8 was observed compared to that of control. Of note, no toxicity of 3-oxo-C12-HSL was observed on the epithelial cell line Caco-2/TC7 (Supplementary Material S1).

2.1.2. AHL 3-Oxo-C12-HSL Anti-Inflammatory Effects on Macrophage Cell Line are Milder

Non-stimulated RAW264.7 macrophages challenged to increasing doses of 3-oxo-C12-HSL did not show changes in IL-6 secretion compared to that of control DMSO. In murine macrophage cell lines stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN γ), we observed a decrease in IL-6 secretion when adding 3-oxo-C12-HSL at 15 μ M as compared to that of the control (Figure 1b). Yet, the reduction was only 17% compared to that of control and did not reach statistical significance. Moreover, no toxicity of 3-oxo-C12-HSL was found between 1 and 50 μ M (Supplementary Material S2).

2.2. The Natural AHL 3-Oxo-C12-HSL but Not C4-HSL Activates LasR

AHL Are Natural Bacterial Modulators and 3-Oxo-C12-HSL Can Activate the LasR Receptor

3-oxo-C12-HSL was tested on the bacterial reporter strain *E. coli* pSB1075 to assess its interactions with the *P. aeruginosa* AHL receptor, LasR, and the resulting activation. As expected, the 3-oxo-C12-HSL elicited a strong activation of LasR, with a read EC₅₀ of 9 nM (Figure 1c). In contrast, the short-chain AHL from *P. aeruginosa*, C4-HSL, showed no induction of luminescence and was then used as a negative control (Figure 1c).

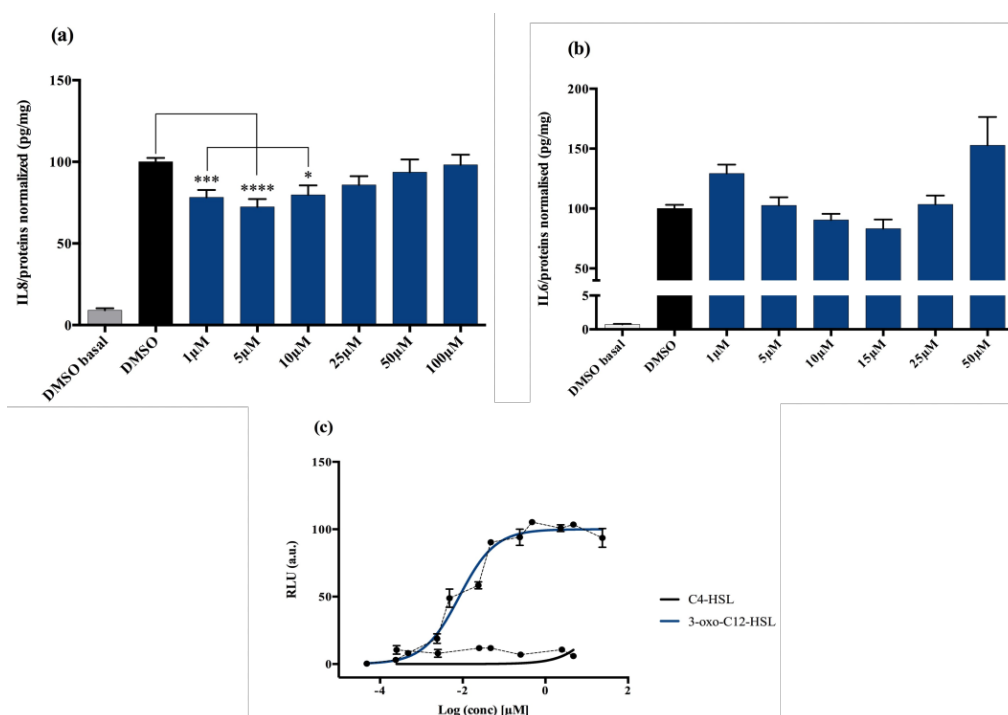


Figure 1. Cell response to 3-oxo-C12-HSL exposure: (a) IL-8 secretion of Caco-2/TC7 cells exposed to IL-1 β and a range of *N*-acyl-homoserine lactones (AHL) concentrations for 18 h. Secreted IL-8 is normalized to control DMSO. Points are the mean of several replicates ($n > 10$) \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. control, one-way ANOVA ($p < 0.0001$), Tukey's post-test. (b) IL-6 secretion of RAW264.7 cells exposed to LPS/TNF- α and a range of AHL concentrations for 6 h. Secreted IL-6 is normalized to control DMSO. Points are the mean of several replicates. (c) Bioluminescence of reporter strain *E. coli* pSB1075 with increasing doses of 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL. Points are the mean value of several replicates ($n > 3$) \pm SEM.

2.3. AHL 3-Oxo-C12-HSL Is an Unstable Molecule in Biological Media

2.3.1. The AHL Instability Results from Its Chemical Characteristics

Degradation at biological pH affords by-products (3) and (4), respectively, called tetramic acid and open-form AHL or 3-oxo-C12-HS (Figure 2a).

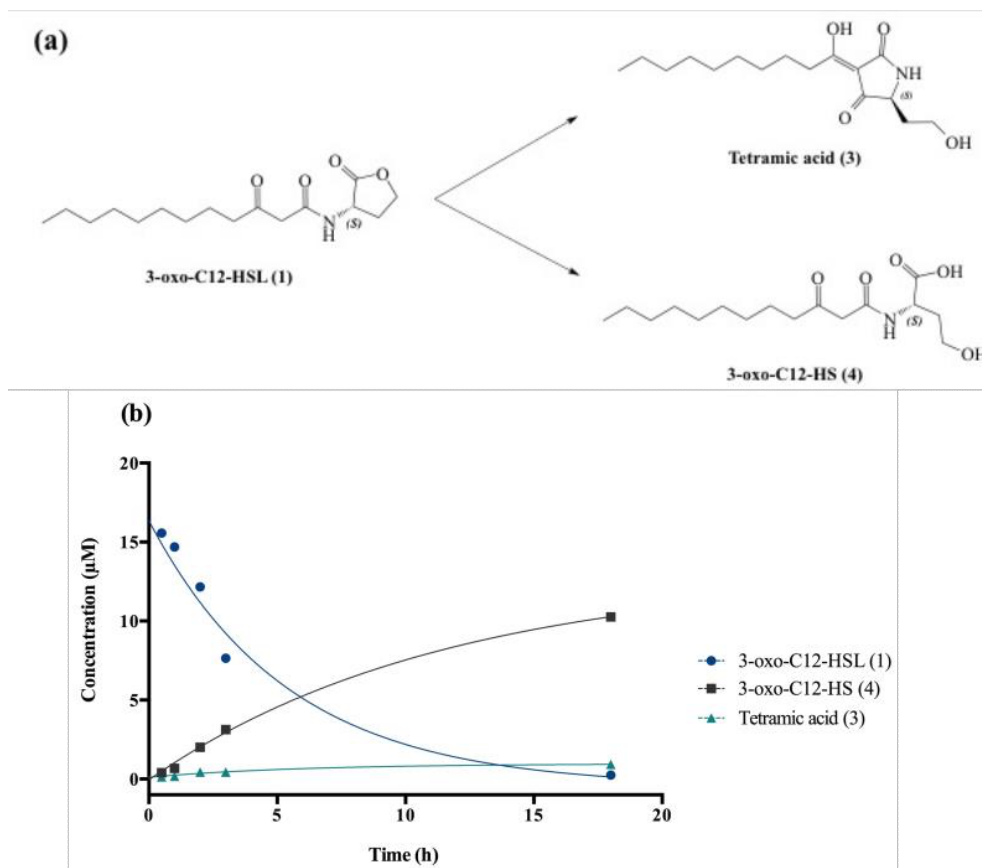


Figure 2. Degradation of 3-oxo-C12-HSL: (a) Degradation scheme into by-products (3) and (4). (b) Kinetics of decay of (1) in cell-free aqueous medium and apparition of tetramic acid (3) and 3-oxo-C12-HS (4).

The chemical composition of a solution of 3-oxo-C12-HSL in non-conditioned cell-free DMEM was studied at room temperature over 24 h. AHL decay gave the expected by-products (3) and (4), and kinetic constants were interpolated using standard curve solutions (Figure 2b). The 3-oxo-C12-HSL degradation follows an apparent first-order mechanism, with apparent constants k_{app} and $t_{1/2}$, respectively, 0.2 h^{-1} and 3.8 h. Overall, the AHL hydrolysis in cell medium was observed within hours, with product (4) largely predominant over product (3) (91:9 ratio).

2.3.2. Biological Study of Tetramic Acid (3)

The degradation product tetramic acid (3) from 3-oxo-C12-HSL was synthesized and its bioactivity studied on both the Caco-2/TC7 and RAW264.7 cell lines and the bacterial reporter. Compared to control, the molecule showed no effect on cell lines but significant cytotoxicity (Supplementary Material S3). In the AHL receptor reporter strain, the molecule acted as a weak agonist of LasR, with an apparent EC_{50} 300-fold greater than that of the parent AHL 1 ($2.7 \text{ } \mu\text{M}$ vs. 9 nM) (Figure 3). Overall, our results suggest tetramic acid (3) cannot be accountable for the observed modulatory effects of 3-oxo-C12-HSL.

2.4. Intracellular Traffic of 3-Oxo-C12-HSL

The entry and distribution of 3-oxo-C12-HSL over time in Caco-2/TC7 cells was examined, in the presence and absence of 2-hydroxyquinoline (2-HQ). 2-HQ inhibits enzymatic PON-mediated hydrolysis of the AHL lactone. The distribution of the inhibitor is predominantly extracellular (Supplementary Material S4). In the presence of 2-HQ, 50% of the AHLs entered the cells within 5 min, and approx. 90% were found in cell lysates after 1 h. Without 2-HQ, only 18% of the AHLs were intracellular after 5 min, and only 65% of the AHLs were internalized over experiment time (Figure 3a).

From these observations we hypothesized that inhibition of PON hydrolysis in the extracellular environment promotes the maintenance of AHL integrity, and thereby its penetration into cells.

While studying the proportional repartition of intact 3-oxo-C12-HSL (1) and degraded 3-oxo-C12-HS (4), it appeared that (1) rapidly hydrolysed into its open homoserine (Figure 3b). By investigating the ratio between molecules (1) and (4) in total cell lysates we observed that the open-form (4) became prevalent within minutes after cell penetration, and was the major form over longer timespans. The absence of 2-HQ retarded the appearance of 3-oxo-C12-HSL's peak concentration from 5 min to 20 min, otherwise no significant difference was observed with or without inhibitor. Overall, the open form dominated in cells, representing between 60 and 95% of the total amount found in cell lysates.

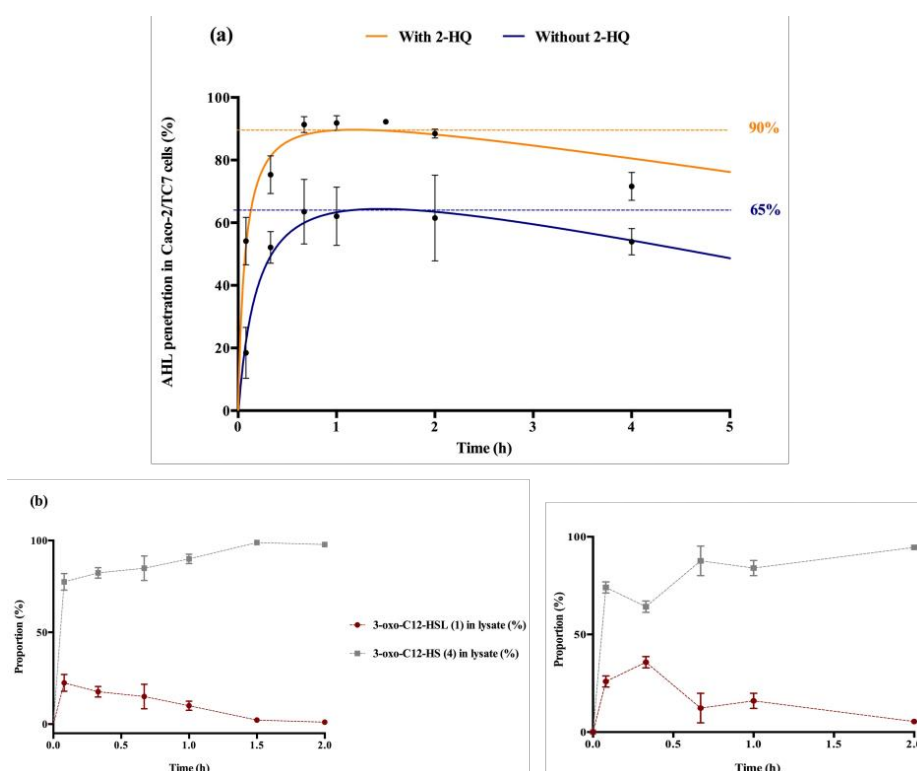


Figure 3. Cellular traffic of 3-oxo-C12-HSL: (a) Influence of 2-HQ on AHL penetration in Caco-2/TC7 cells over time, expressed as % of initial AHL concentration. (b) Time evolution of 3-oxo-C12-HSL and 3-oxo-C12-HS % in Caco-2/TC7 cell lysates in the presence (left) or absence (right) of 100 μ M 2-HQ (truncated time profile). Points are the mean value of replicates ($n = 3$) \pm SEM.

The 3-oxo-C12-HSL limited stability in biological media, and its activating properties on bacteria are ill-suited for direct use as an ecological drug, although the AHL evidently possesses mild anti-inflammatory properties. However, a library of analogues was designed in order to take advantage of the latter anti-inflammatory properties. It allowed for the identification of chemical structures in our cell models, without exhibition of bacterial activation and stability issues.

2.5. Structure-Activity Relationship in AHL and Identification of Two Hit Compounds

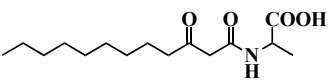
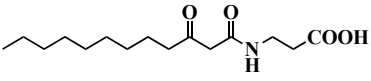
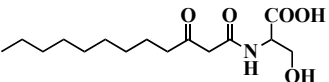
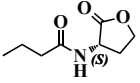
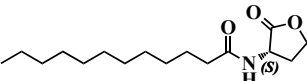
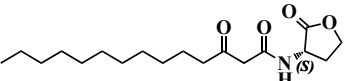
2.5.1. Construction of a Library of AHL Analogues

Using 3-oxo-C12-HSL (1) as a framework, chemical characteristics of the AHL molecular class were challenged for their impact on biological activity. Chemical modifications were performed on the acyl chain, the C3-ketone and the lactone headgroup, to build a total library of 22 compounds (Table 1).

Table 1. Overview of the AHL analogues library.

Entry	Common Name	Structure
1	(S)-3-oxo-C12-HSL	
2	(S)-3-oxo-C12:2-HSL	
9	(S)-3-dioxolane-C12-HSL	
26	(S)-3-oxo-C6-HSL	
27	12-N3-(S)-3-oxo-C12-HSL	
28	(R)-3-oxo-C12-HSL	
29	(S)-3-oxo-C12-HTL	
30	(S,S)-3-oxo-C12-ACH	
31	(R,S)-3-oxo-C12-ACH	
32	3-oxo-C12-p-methoxyanilide	
33	3-oxo-C12-o-methoxyanilide	
34	3-oxo-C12-m-methoxyanilide	
35	3-oxo-C12-2,4-aminochlorophenol	
36	3-oxo-C12-Bz	
37	3-oxo-C12-aminopiperidine	
38	3-oxo-C12-fructose	

Table 1. Cont.

Entry	Common Name	Structure
39	3-oxo-C12-Ala	
40	3-oxo-C12-β-Ala	
41	3-oxo-C12-Ser	
42	(S)-C4-HSL	
43	(S)-C12-HSL	
44	(S)-3-oxo-C14-HSL	

The synthetic strategy was adapted from published literature (Supplementary Material S5), and enhanced with additional steps (Supplementary Material S6), to afford increased yields, easier purifications, and improved synthetic flexibility [22–27]. The total synthesis of natural AHL and bio-inspired analogues started with the coupling of an appropriate carboxylic acid to Meldrum's acid. The resulting intermediate was refluxed in methanol to yield the corresponding carboxylic acid methyl ester. The ketone was protected with ethylene glycol, and the terminal ester hydrolyzed to the free carboxylic acid. This acid was coupled to the appropriate headgroup, and finally the ketone deprotection afforded the target compound. Meanwhile, the synthesis of non-3-oxo AHLs was straightforward and required only one step: coupling of an appropriate carboxylic acid with the headgroup (Supplementary Material S6). The resulting library contained natural AHLs, analogues, and other closely related molecules, spanning across a variety of acyl chain lengths, headgroups, and C3 substitution patterns.

2.5.2. Compared Results of the Two New Molecules on Mammalian Cell Lines versus the Parent AHL

Analogue (*S,S*)-3-oxo-C12-ACH (30): Although, this analogue showed a similar level of reduction of IL-8 secretion in IL-1 β stimulated Caco-2/TC7 cells as that of 3-oxo-C12-HSL (1) (Figure 4a), its effect was stronger on RAW264.7 macrophages. The (*S,S*)-isomer analogue revealed a 52% reduction of IL-6 at 50 μ M (Figure 4b), without cytotoxicity (Supplementary Material S7).

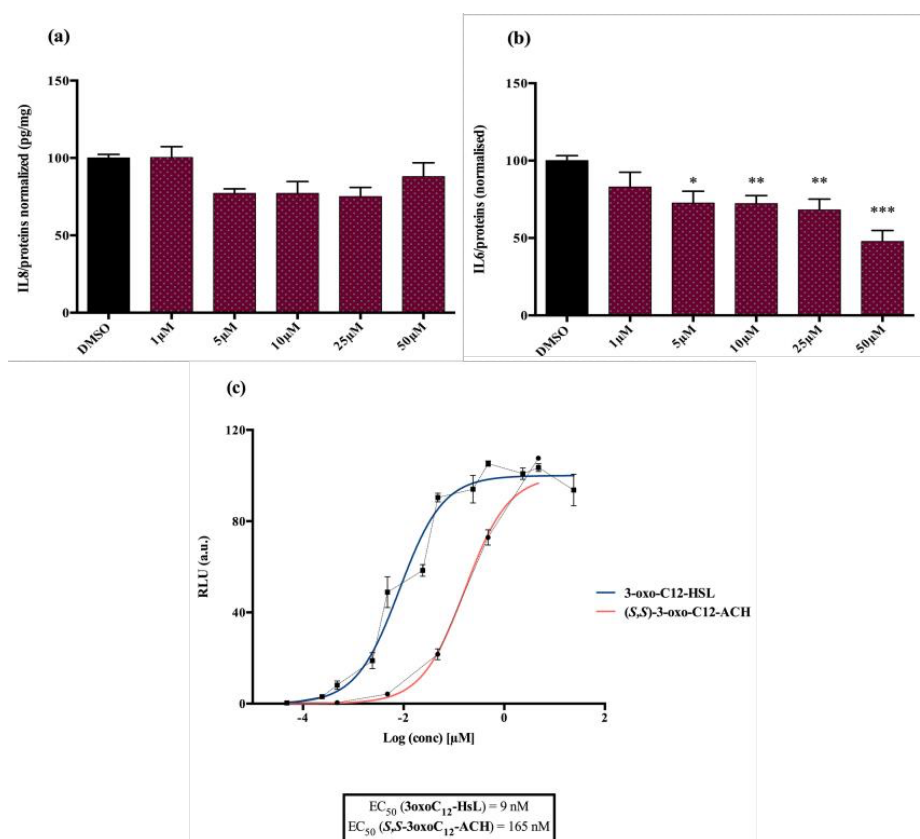


Figure 4. Biological activity of (*S,S*)-3-oxo-C12-ACH: (a) IL-8 secretion of Caco-2/TC7 cells exposed to inflammation and increasing doses of (*S,S*)-3-oxo-C12-ACH for 18 h. Secreted IL-8 normalized to control DMSO. Points are the mean of several replicates ($n \geq 8$) \pm SEM. No statistical difference vs. control observed in Tukey's post-test, yet positive one-way ANOVA ($p < 0.0001$). (b) IL-6 secretion of RAW264.7 cells exposed to LPS/TNF- α and increasing doses of (*S,S*)-3-oxo-C12-ACH for 6 h. Secreted IL-6 normalized to control DMSO. Points are the mean of several replicates ($n \geq 8$) \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p > 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control, one-way ANOVA ($p < 0.0001$), Tukey's post-test. (c) Compared bioluminescence in reporter strain *E. coli* pSB1075 with increasing doses of 3-oxo-C12-HSL (1) and (*S,S*)-3-oxo-C12-ACH (30). Points are the mean value of several replicates ($n \geq 6$) \pm SEM.

Analogue 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol (35): Compared to 3-oxo-C12-HSL (1), this analogue showed a 50% reduction of IL-8 secretion by stimulated Caco-2/TC7 epithelial intestinal cells with a clear dose-dependent effect (Figure 5a). Moreover, we observed a 60% reduction in IL-6 secretion by stimulated RAW264.7 at 15–50 μ M. There was no cytotoxicity on both studied cell lines induced by analogue (35) (Supplementary Material S8). This analogue appears the most active of our library (Figure 5b).

2.5.3. The (*S,S*)-3-Oxo-C12-ACH (30) Activated LasR While the 3-Oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol (35) Did Not

Analogue (*S,S*)-3-oxo-C12-ACH (30) is an agonist of the bacterial receptor with EC₅₀ of 170 nM (Figure 4c. In contrast, molecule (35) showed an inability to induce luminescence when incubated with the biosensor (Figure 5c). After demonstrating that the two analogues were non-toxic to the bacteria, the ACP analogue (3-oxo-C12-2,4-aminochlorophenol) was tested in an inhibition assay (Figure 5d). It was concluded that molecule (35) was a weak LasR antagonist, with an IC₅₀ of 28.2 μ M.

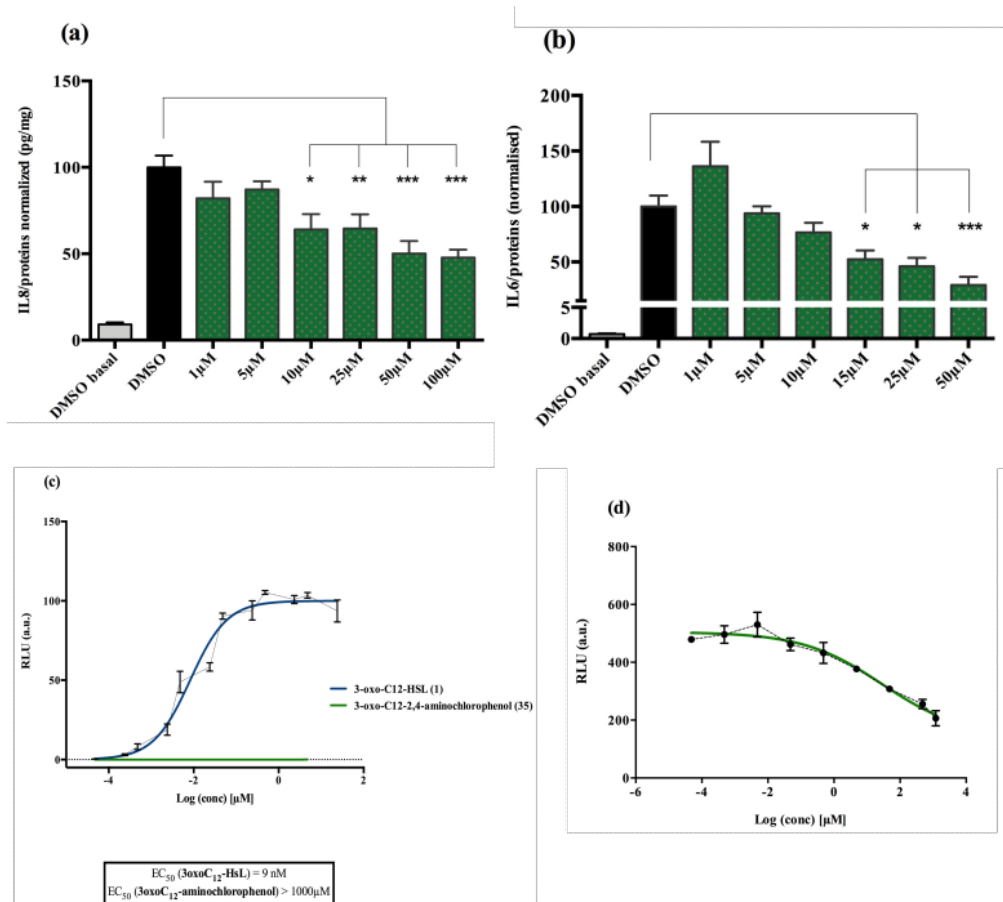


Figure 5. Biological activity of 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol: (a) IL-8 secretion of Caco-2/TC7 cells exposed to inflammation and increasing doses of 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol for 18 h. Secreted IL-8 normalized to control DMSO. Points are the mean of several replicates ($n > 7$) \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p > 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control, one-way ANOVA ($p < 0.0001$), Tukey's post-test. (b) IL-6 secretion of RAW264.7 cells exposed to LPS/TNF- α and increasing doses of 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol for 6 h. Secreted IL-6 normalized to control DMSO. Points are the mean of several replicates ($n \geq 8$) \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control, one-way ANOVA ($p < 0.0001$), Tukey's post-test. (c) Compared bioluminescence in reporter strain *E. coli* pSB1075 with increasing doses of 3-oxo-C12-HSL (1) and 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol (35). Points are the mean value of several replicates ($n \geq 6$) \pm SEM. (d) Inhibition of 3-oxo-C12-HSL-induced bioluminescence in *E. coli* pSB1075 with increasing doses of 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol. Points are the mean value of several replicates ($n \geq 6$) \pm SEM.

3. Discussion

Natural 3-oxo-C12-HSL exerts modest anti-inflammatory effects on epithelial and macrophage cell lines but remains unstable. Our study indicates that AHL analogues with stronger biological effects can be found from a synthetic library derived from 3-oxo-C12-HSL (1). This strategy allowed us to find out a stable analogue, 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol (35), exerting a strong anti-inflammatory effect on both cell lines without activating the bacterial AHL receptor LasR. These properties make it a good candidate to be a new anti-inflammatory molecule to prevent intestinal inflammation.

3.1. Stability and Concentration

As signal molecules, it is not unexpected that AHLs degrade rapidly after secretion. Indeed, AHL-sensing allows bacteria to detect other members of the colony. Hence it is important that AHLs get degraded to ensure their concentration closely reflects the temporal dynamics of the bacterial population. Human niches represent bio-diverse environments where AHLs could play a

signaling role. In the pulmonary ecosystem, Losa et al. demonstrated parallel evolutions between 3-oxo-C12-HSL concentration and *P. aeruginosa* loads [28]. In the gut ecosystem, our group previously showed that 3-oxo-C12:2-HSL correlates to normobiosis, higher counts of Firmicutes, and lower counts of *E. coli* [17]. However, the 3-oxo-C12-HSL is unstable at biological pH due to two main degrading phenomena: a spontaneous, irreversible, and non-enzymatic rearrangement according to a Claisen-like mechanism to produce tetramic acid (3) and the hydrolysis of its lactone ring to produce the open-form (4). Our results suggest that these by-products do not have anti-inflammatory properties. Moreover, we have shown, in accordance with the literature that 3-oxo-C12-HSL can enter cells within minutes [29,30]. This compromises pH-dependent hydrolysis in the extracellular compartment and rises the problem of AHL enzymatic degradation.

Our experiments described a short half-life for 3-oxo-C12-HSL incubated at 37 °C in the presence of Caco-2/TC7 cells. This result is concordant with findings from Losa et al. on polarized bronchial epithelial cells [28]. Indeed, eukaryotic cells secrete degrading enzymes that catalyze lactonolysis reactions to produce open-ring AHLs, called lactonases. In particular, lactone-hydrolyzing paraoxonases (PON) are expressed in most human tissues, including the intestine [31], and are conserved in post-confluency, differentiated, and polarized Caco-2 cells [32–35]. Our results show that using a competitive PON inhibitor in the extracellular compartment increases the half-life of undegraded AHLs in cell supernatant and improves their capacity to penetrate the intracellular compartment. Inside cells, the molecule is not protected by the PON inhibitor anymore, and rapidly hydrolyzes into 3-oxo-C12-HS. Kravchenko et al. made similar findings on macrophages [36]. Their results were later confirmed by Horke et al. on several PON2-producing cell lines [37]. We believe that PON are required intracellularly for AHL activity, while their extracellular presence will prevent AHL cell penetration and thus decrease the observed effects. This is supported by literature demonstrating that the 3-oxo-C12-HSL cellular effects were reversed after incubation with PON inhibitor TQ416, suggesting that AHL requires PON-mediated intracellular hydrolysis to perform its function [37–39]. Our hypothesis does not refute the statement that the structural integrity of the lactone ring is required to mediate its effects on mammalian cells [27,36]; but rather we believe that lactone is required to mediate AHL penetration into cells, like a pro-drug.

It seems quite important to examine the dosage of AHL employed in our experiments and its biological relevance. AHLs have been identified in vivo in an array of fluids, from human sputum to bacterial biofilms, and now in feces as reported by our team [17]. “Indirect” sampling, where samples are not taken in the immediate cellular surroundings, shows very low AHL concentrations. It is, however, probable that this method may only provide insights of the actual AHL levels or may undergo technical bias. Thus, concentrations ranging from 1 to 20 nM were detected in the sputum of patients with cystic fibrosis [40], while 0.2 to 2 nM/g AHL were found in fecal samples from IBD patients. In contrast, very high concentrations of AHL are measured in *P. aeruginosa* biofilms: levels as high as 300–600 µM have been reported by Charlton et al., and biofilms have been identified in the lungs of infected cystic fibrosis patients [41]. Our work aimed at exploring AHL’s effects on cells lines in the context of gut inflammation driven by local dysbiotic microbiota. Planktonic *P. aeruginosa* secrete AHLs at low micromolar concentrations [42], similar to the concentrations detected in a murine model of *P. aeruginosa* acute lung infection (1–20 µM). Hence, we thought it was relevant to broaden this concentration range to 1–100 µM, which could be the AHL dose range that intestinal cells from an IBD patient would encounter in a non-infected but inflammatory and dysbiotic state.

3.2. Choice of Chemical Modifications

Requirements for full AHL activity on mammalian cell lines are traditionally described as follows: integrity of the lactone head, an acyl chain from 10–14 carbons, and an oxo or hydroxyl substitution at carbon-3 [27,36,43]. Our chemical modifications aimed at challenging each of these requirements and identifying analogues of 3-oxo-C12-HSL with valuable activity.

Eight molecules (2, 9, 26, 27, 42, 43, and 44) were chosen to investigate the influence of ketone substitution, acyl chain length, substitution, and saturation. Fifteen analogues with modified headgroups but that retained the other native patterns (12-carbon-long acyl chain and 3-oxo substitution) were synthesized to study the involvement of the lactone headgroup in activity. The headgroups were selected according to four parameters: the stereochemistry of the α -carbon to the lactone ring, the influence of electron-donating atoms in the ring, the ring size, and the capacity to be hydrolyzed.

The stereochemistry of the lactone is crucial in natural AHL, where only the (*L*)-enantiomer is active. Chhabra et al. have in particular demonstrated that the immunomodulatory activity of AHLs depended critically on their (*L*)-conformation [27]. Where possible, the (*S*)-stereochemistry was conserved and the reverse enantiomer was synthesized for comparison, while some headgroups were voluntarily selected for their planar structure. All headgroups but one included electron-donating atoms, whose lone pairs promote H-bonds formation and non-covalent interactions of the molecule in its active site. Most of the synthetic compounds cannot be hydrolyzed because they are resistant to lactonolysis. Three hydrolysable molecules were included: the (*R*)-lactone and thiolactone rings remain sensitive to hydrolysis.

3.3. Structure–Activity Relationship in AHL and Analogues

Our molecular library highlighted conservative and deleterious modifications to AHL cellular activity. Overall, we confirmed the need for the acyl chain and carbon-3 substitution. Maximum activity is achieved with 12–14 carbon-long chains, and carbon substitution with linear heteroatoms has moderate effects. Addition of large groups on C3 abolishes activity, while the complete removal of substituent weakens it. Results on AHL ring substitution have widened the spectrum of possibilities, until now believed to be restricted to homoserine groups only. Headgroups that retained activity include the homocysteine lactone rings, amino-cyclohexanol, and amino-chlorophenol. Surprisingly, the thiolactone group, closest to native HSL in terms of structure, retained good biological activity but was not the most active. Both lead candidates (*S,S*)-3-oxo-C12-ACH and 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol exhibit common features: they are 6-membered rings with hydroxyl group in the *ortho* position. The major difference is the nature of those rings, which impacts their 3D structures and spatial interactions. Aromatic rings are less flexible than saturated rings and cannot accommodate to best fit their receptor, but their locked conformation can confer energetic advantages. This assumption should, however, be verified by proper docking and partner investigation.

Bacterial results are in accordance with the published literature. Modest modifications of the alkyl chain have important impacts on the molecule capacity to bind the LasR receptor. Only tail length ranging from 10–14 carbons retains activity in the nanomolar range, including analogues with a heteroatom. Besides length, alkyl chain flexibility seems required to retain activity, as confirmed in the literature [44,45]. Smith et al. pioneered the investigation of AHL analogues with aminocyclohexanol headgroups. The group described the (*S,S*)-isomer (30) as a LasR agonist with inducing properties similar to that of native 3-oxo-C12-HSL [46]. The authors hypothesized that the hydroxyl group of amino-cyclohexanol appropriately mimics the carbonyl group of native AHL to participate in H-bonds, while the cyclohexane ring mimics the ring structure in hydrophobic interactions.

Aromatic AHL analogues have been described as LasR antagonists by several groups [25,46–49]. Observing that both (35) and a 2-aminophenol AHL analogue exhibited similar LasR antagonisms, Smith et al. assumed the pattern of adjacent hydroxyl and amino groups was required for activity in aromatic rings, like in aminocyclohexanol analogues. The unsaturated carbon bonds would then create a difference in behavior between agonism and antagonism.

It is important to note that 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol (35) best meets the criteria we defined for lead candidate. On top of demonstrating improved activity on mammalian cell assays and being PON-resistant, this analogue does not positively modulate the bacteria LasR receptor. The molecule is furthermore not toxic for bacterial populations. Bactericidal properties could indeed be deleterious in dysbiotic and immuno-compromised individuals, as they would make ecological niches available for

colonization by pathogenic bacterial communities. In contrast, analogue (*S,S*)-3-oxo-C12-ACH (30) exhibits promising activity on mammalian models, but its LasR agonistic behavior might prevent it from future *in vivo* experimentation.

3.4. Future Work

From our results, one can imagine testing molecules of interest, such as the 3-oxo-C12-2-amino-4-chlorophenol, *in vivo*. Indeed, our study paved the way to understanding the relationships between AHL-derived molecules in an environment as complex as the intestine. The stability of the molecule, the absence of recognition by AHL receptors, and its anti-inflammatory effect on murine macrophages indicate the next steps of our study. In this setting, a murine model of colitis appears a good model to evaluate the impact of (35) on gut inflammation without modifying gut microbiota. Another implementation of our work could be to synthesize labelled AHLs of interest to perform molecular imaging and functional assays. Labelling could be done at multiple positions. The substitution should preserve the whole structure and be “transparent”. We are currently thinking of short PEG groups attached to a biotin or a fluorescein in position C12, or on the 3-keto group. The resulting fluorescent analogue (35) could then be used for cell and tissue imaging, and to localize and follow the fate of the compound in epithelial and immune cells. Using the same method, a biotinylated molecule could help identify molecular partners *in vivo*. For instance, AHL-coated beads can be used to extract relevant ligand proteins from human intestinal epithelial Caco-2/TC7 cells. This technique was already proven successful in finding eukaryotic ligands (T2R38 and IQGAP1) of the 3-oxo-C12 AHL [50,51].

To conclude, gut microbiota mutually interacts with co-evolved host epithelial and immune cells in a beneficial reciprocal relationship. QS-signaling of bacteria probably contribute substantially to establishing symbiotic interactions in some cross-kingdom interactive dynamics. Searching for QS-derived molecules to control host immune responses appears to be a completely novel and original approach from a medical perspective. Our study opens this new field of research showing that more stable and efficient anti-inflammatory molecules derived from AHLs can be found. Moreover, development of such an approach could help in understanding the mechanisms of action and degradation of these diffusible signaling molecules that impact human gut physiology.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

2-hydroxyquinoline, 3-oxo-C12-HSL, and sterile DMSO were bought from Sigma. All chemical reagents were purchased from commercial suppliers Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) and TCI Chemicals (Paris, France), and used without further purification.

4.2. Cell Culture Methods

Caco-2/TC7 cells were seeded at 10^5 cells/well in 6-well plastic culture plates and maintained in high glucose medium (DMEM GlutaMAX 4.5 g/L glucose, ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA) supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, GE Healthcare, Life Science, Chicago, IL, USA), 1% non-essential amino acids NEAA, and 1% penicillin-streptomycin (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cells were cultured at 37 °C in a 10% CO₂/air atmosphere. The media were changed every day. Confluency was reached on day 6. On day 17, the cells were serum-starved, and used for stimulation on day 18.

RAW264.7 murine macrophage cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 1% 200 mM L-glutamine (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The macrophages were seeded at 40,000 cells/well in 24-well plates, upon reaching 80–90% confluence after 4-day culture. The cells were maintained at 37 °C with 5% CO₂/air atmosphere and the media were changed every other day.

4.3. Cell Stimulation Protocols

For stimulation, Caco-2/TC7 cell medium was serum-free and supplemented with 100 μ M 2-HQ (Sigma, Saint-Louis, Missouri, USA). The cells were incubated for 18 h at 37 °C with stimulation medium containing 0.1% DMSO or tested compounds, with or without a pro-inflammatory cytokine (IL-1 β at 25 ng/mL). After 18 h, the supernatants were collected, and stored at –80 °C before IL-8 quantification by ELISA (Duoset Human CXCL8/IL-8, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to manufacturer's instructions. Cells were washed with PBS 1X and lysed in PBS 1X containing 1% triton X-100. Cells were harvested by scraping and stored at –80 °C before protein quantification by BCA assay (Interchim, Montluçon, France).

RAW264.7 cells were incubated for 6 h at 37 °C with stimulation medium containing 0.1% DMSO or tested compounds, with or without LPS (10 ng/mL, Sigma, Saint-Louis, Missouri, USA) and IFN- γ (20 U/mL, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) to establish inflammation. After 6 h, the supernatants were collected, and stored at –80 °C before IL-6 quantification by ELISA (BD OptEIA Mouse Il-6 ELISA Set kit BD Biosciences, Eysins, Vaud, Switzerland), according to manufacturer's instructions. Cells were harvested by scraping and stored at –80 °C before protein quantification by BCA assay (Interchim, Montluçon, France).

Cytotoxicity was monitored via the dosage of LDH released. LDH assays (Roche, Basel, Switzerland) were performed immediately before freezing. All cell experiments were done in triplicates.

4.4. Bacterial AHL Receptor Reporter Assay

The AHL receptor reporter strain contains a pSB1075 plasmid with genes encoding for tetracycline resistance and expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AHL receptor LasR, as well as a fusion gene from the LasR promoter and the luxCDABE gene from *Photobacterium luminescens*. On day 1, a 1/100 dilution of the bacterial strain (P1) was grown for 24 h at 37 °C under agitation in LB medium containing tetracycline. The bacterial culture was diluted on day 2, and in a black 96-well plate were placed 200 μ L of P2 and 10 μ L of compound (medium, water, and DMSO for negative controls, C4-HSL and 3-oxo-C12-HSL for positive controls, or tested sample). The plate was incubated for 4 h at 37 °C under agitation. Luminescence was read at endpoint at all wavelengths on a microplate reader. Data were normalized using the 3-oxo-C12-HSL as a 100%-induction response as a means for comparison.

4.5. Chemical Synthetic Procedures

Unless otherwise stated, all reactions were performed under argon atmosphere in dry glassware.

4.5.1. Total Synthesis of 3-Oxo-substituted Natural AHL and Analogues

The appropriate carboxylic acid was conjugated to Meldrum's acid by EDC- and DMAP-mediated coupling. The resulting Meldrum's acid derivative 5a-c underwent methanolysis by reflux in excess methanol. The ketone of the resulting 3-ketomethyl ester 6a-c was then ketal-protected with ethylene glycol in toluene, to afford the ketal-protected methyl ester 7a-c. The methyl ester was then removed through basic hydrolysis using NaOH in THF, to afford the free carboxylic acid 8a-c. The resulting ketal-protected carboxylic acid was linked to the appropriate headgroup, by means of EDC- and DMAP-mediated coupling in DCM. The ketone of the final intermediates 9–25 was freed by ketal-removal in TFA and water, to afford the desired final products 26–41. If necessary, at any stage of this synthesis, the intermediate was purified by flash chromatography [22,24–27,47,52,53].

4.5.2. Synthesis of Terminal Azido-Carboxylic Acids

The appropriate bromo-carboxylic acid (1.0 equiv) and sodium azide (1.5 equiv) were dissolved in DMF. The reaction was heated to 60 °C and stirred overnight under an argon atmosphere. At completion, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in a 1:1:1 (v/v/v) mixture of EtOAc, H₂O, and brine. Organic compounds were extracted with EtOAc and washed with

half-saturated brine before drying (magnesium sulfate). Solvents were removed under vacuo to afford product as an oil [54].

4.5.3. Synthesis of Non-3-Substituted AHLs

To a stirred solution of (S)-(-)-(α)-amino-butyrolactone hydrochloride (1.0 equiv) in DCM were added Et₃N (2.2 equiv) and the appropriate acyl chloride (1.0 equiv), on an ice bath. After dissolution, the ice bath was removed, and the mixture allowed to rise to room temperature. It was then stirred overnight at room temperature. At completion, the reaction mixture was washed with 1M HCl and brine, dried, and solvents were removed under vacuo to afford the desired product. If necessary, the product was purified by flash chromatography in EtOAc/cyclohexane [55].

4.5.4. Synthesis of 3-Acyltetramic Acids from 3-Oxo-C12-HSL

A solution of 0.5 M sodium methoxide in methanol (1.0 equiv) was added to a stirred solution of 3-oxo-C12-HSL (1.0 equiv) in methanol. The reaction mixture was stirred for 3 h at 55 °C and then overnight at 50 °C. The mixture was cooled to room temperature and then passed through an acidic ion exchange resin. The resin was eluted with MeOH, the eluents combined, and concentrated in vacuo to afford the desired tetramic acid as a solid. If necessary, the product was purified by flash chromatography [56,57].

4.6. Mass Spectrometry: Tandem LC/MS-MS

Evaluation of AHL half-life in cell culture medium at room temperature: The AHL was dissolved at 15 μ M in DMEM GlutaMax and the solution stirred at room temperature. Samples (1 mL) were taken at intervals over 24 h, and extracted twice with 1 mL EtOAc, then acidified with 1M HCl solution to decrease pH to approximately 4–5, and extracted again with 1 mL EtOAc. All aqueous and organics phases were stored at –80 °C before treatment and analysis. For MS sample preparation, the organic extracts and aqueous phases were evaporated under a nitrogen stream at 50 °C. The residues were dissolved in 250 μ L MeOH (HPLC grade) and placed in 2 mL MS vials (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with 250 μ L inserts (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4.7. Kinetic Study of AHL Cellular Entry

Eighteen-day-old serum-starved Caco-2/TC7 were incubated with 1 mL/well of starvation medium containing 15 μ M 3-oxo-C12-HSL, with or without 100 μ M 2-HQ. At regular intervals, supernatants of selected wells were removed and placed in 1.5 mL Eppendorf microtubes, while the cells were scrapped in 500 μ L ice-cold PBS 1X and lysed by sonication. All samples were extracted twice with EtOAc using a vortex and 3 min centrifugation at 5000 rpm. Aqueous phases were acidified with 20 μ L of 1M HCl solution to bring the pH to 4, and extracted with EtOAc again following the same protocol. All aqueous and organics phases were stored at –80 °C before treatment and analysis. MS sample preparation was achieved as previously described.

4.8. AHL Detection by Tandem HPLC-MS/MS

The chromatographic separation of compounds was carried out on a Zorbax eclipse XDB-C18 column (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) fitted on an Agilent 1100 tandem HPLC-MS/MS system. Column's temperature was 45 °C. Then, 5 μ L of compound solution were injected. The mobile phases consisted of (A) water with 0.1% formic acid and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid in an 80:20 starting ratio, respectively. The linear gradient for AHL elution was programmed as follows: After increasing B in A from 20% to 40% over 5 min, and from 40% to 95% over 15 min, the gradient was kept constant over 10 min before 5 min re-equilibration (overall run time 35 min). Separation was achieved at a flow rate of 0.4 mL/min. This method allowed for separation of AHLs based on hydrophobicity.

Mass spectra were obtained using an API[®] 2000 Q-Trap (AB-Sciex, Villebon sur Yvette, France) equipped with a TurboIon electrospray set in the positive mode with nitrogen as the nebulizer gas. The ion source temperature was set at 350 °C. Declustering and entrance potentials were set at 60 V and 5000 V, respectively. Data were acquired by the Analyst[®] software (version 1.4.2, AB-Sciex, Villebon sur Yvette, France) in the multiple reaction monitoring mode.

AHL quantification was expressed in $\mu\text{mol/L}$ after calibration with commercially available 3-oxo-C12-HSL and normalization relative to the internal standard *N*-butyryl-L-homoserinelactone-d5 (C4-d5-HSL, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

4.9. Statistical Analysis

All data are represented as mean \pm SEM of independent experiments and were tested for gaussian distribution. Statistical significance was examined by means of one-way ANOVA associated with post-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical analyses were realized using software Prism 6.0, GraphPad.

5. Patents

A patent “Analogues of *N*-acyl-homoserine lactones and Pharmaceutical composition comprising them” PAT2602795PC00 has been registered in France and submitted to the European Office of La Haye PCT/EP2020/079913 (23 October 2020).

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9448/s1>.

Author Contributions: Conceptualization J.-M.M., J.-P.G., G.C., D.R., P.S., and A.P.; methodology J.-P.G., L.B., G.C., J.-M.M., D.R., and A.P.; validation J.-P.G., J.-M.M., and P.S.; investigation, A.P., G.C., and L.B.; Chemistry: J.-M.M. and A.P.; Mass: D.R. and A.P.; resources, J.-M.M. and P.S.; writing—original draft preparation A.P.; writing—review and editing P.S., G.C., and A.P.; supervision L.B., J.-P.G., J.-M.M., and D.R.; funding acquisition P.S., J.-P.G., and J.-M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fondation pour la Recherche Médicale, grant number EQU202003010171 and by Association François Aupetit (projects research on AHLs 2013 and 2019). A. Peyrottes was the recipient of a fellowship from Sorbonne University IPV (Interface pour le vivant) program and G. Coquant was the recipient of a fellowship from Fondation pour la Recherche Médical FRM ECO201806006843.

Acknowledgments: The authors acknowledge the Association François Aupetit for its unwavering support.

Conflicts of Interest: P.S. declares consulting fees from Abbvie, Takeda, Merck-MSD, Pfizer, Astellas, Janssen, and Biocodex and grants from Biocodex and Janssen. COI are not related with the present work. A.P., G.C., L.B., D.R., J.-P.G., and J.-M.M. declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

2-HQ	2-hydroxyquinoline
ACH	Amino-cyclohexanol
AHL	<i>N</i> -Acyl Homoserine Lactone
DCM	Dichloromethane
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
HSL	Homoserine Lactone
IFN γ	Interleukine-8
LPS	Interferon- γ
IL-8	Lipopolysaccharide
PON	Paraoxonase
QS	Quorum Sensing

References

1. Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* **2016**, *14*, e1002533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Jandhyala, S.M. Role of the normal gut microbiota. *WJG* **2015**, *21*, 8787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kaser, A.; Zeissig, S.; Blumberg, R.S. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 573–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Holm, A.; Vikström, E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: Signals, targets, and functions. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Pacheco, A.R.; Sperandio, V. Inter-kingdom signaling: Chemical language between bacteria and host. *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12*, 192–198. [[CrossRef](#)]
6. Shiner, E.K.; Rumbaugh, K.P.; Williams, S.C. Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29*, 935–947. [[CrossRef](#)]
7. Guo, J.; Yoshida, K.; Ikegame, M.; Okamura, H. Quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone: An all-rounder in mammalian cell modification. *J. Oral Biosci.* **2020**, S1349007920300013. [[CrossRef](#)]
8. Hooi, D.S.W.; Bycroft, B.W.; Chhabra, S.R.; Williams, P.; Pritchard, D.I. Differential immune modulatory activity of pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecules. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 6463–6470. [[CrossRef](#)]
9. Vikström, E.; Tafazoli, F.; Magnusson, K.-E. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6921–6928. [[CrossRef](#)]
10. Vikström, E.; Bui, L.; Konradsson, P.; Magnusson, K.-E. The junctional integrity of epithelial cells is modulated by Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315*, 313–326. [[CrossRef](#)]
11. Eum, S.Y.; Jaraki, D.; Bertrand, L.; Andras, I.E.; Toborek, M. Disruption of epithelial barrier by quorum-sensing N-3-(oxododecanoyl)-homoserine lactone is mediated by matrix metalloproteinases. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **2014**, *306*, G992–G1001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Liu, Y.-C.; Chan, K.-G.; Chang, C.-Y. Modulation of Host Biology by Pseudomonas aeruginosa quorum sensing signal molecules: Messengers or traitors. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Tao, S.; Sun, Q.; Cai, L.; Geng, Y.; Hua, C.; Ni, Y.; Zhao, R. Caspase-1-dependent mechanism mediating the harmful impacts of the quorum-sensing molecule N-(3-oxo-dodecanoyl)-l-homoserine lactone on the intestinal cells. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Glucksam-Galnoy, Y.; Sananes, R.; Silberstein, N.; Krief, P.; Kravchenko, V.V.; Meijler, M.M.; Zor, T. The bacterial quorum-sensing signal molecule N-3-Oxo-Dodecanoyl-L-Homoserine lactone reciprocally modulates Pro- and anti-inflammatory cytokines in activated macrophages. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 337–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Aguanno, D.; Coquant, G.; Postal, B.G.; Osinski, C.; Wieckowski, M.; Stockholm, D.; Grill, J.-P.; Carrière, V.; Seksik, P.; Thenet, S. The intestinal quorum sensing 3-oxo-C12:2 Acyl homoserine lactone limits cytokine-induced tight junction disruption. *Tissue Barriers* **2020**, 1832877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. DiMango, E.; Ratner, A.J.; Bryan, R.; Tabibi, S.; Prince, A. Activation of NF-kappaB by adherent Pseudomonas aeruginosa in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J. Clin. Investig.* **1998**, *101*, 2598–2605. [[CrossRef](#)]
17. Landman, C.; Grill, J.-P.; Mallet, J.-M.; Marteau, P.; Humbert, L.; Balc'h, E.L.; Maubert, M.-A.; Perez, K.; Chaara, W.; Brot, L.; 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. [[CrossRef](#)]
18. Chhabra, S.R.; Philipp, B.; Eberl, L.; Givskov, M.; Williams, P.; Cámara, M. extracellular communication in bacteria. In *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II*; Topics in Current Chemistry; Schulz, S., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2004; Volume 240, pp. 279–315. ISBN 978-3-540-21308-6.
19. Ziesche, L.; Wolter, L.; Wang, H.; Brinkhoff, T.; Pohlner, M.; Engelen, B.; Wagner-Döbler, I.; Schulz, S. An unprecedented medium-chain diunsaturated N-acylhomoserine lactone from marine roseobacter group bacteria. *Marine. Drugs* **2019**, *17*, 20. [[CrossRef](#)]

20. Ziesche, L.; Bruns, H.; Dogs, M.; Wolter, L.; Mann, F.; Wagner-Döbler, I.; Brinkhoff, T.; Schulz, S. Homoserine lactones, methyl oligohydroxybutyrates, and other extracellular metabolites of macroalgae-associated bacteria of the roseobacter clade: Identification and functions. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2094–2107. [[CrossRef](#)]
21. Thiel, V.; Kunze, B.; Verma, P.; Wagner-Döbler, I.; Schulz, S. New structural variants of homoserine lactones in bacteria. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1861–1868. [[CrossRef](#)]
22. Hodgkinson, J.T.; Galloway, W.R.J.D.; Casoli, M.; Keane, H.; Su, X.; Salmond, G.P.C.; Welch, M.; Spring, D.R. Robust routes for the synthesis of N-acylated-L-homoserine lactone (AHL) quorum sensing molecules with high levels of enantiomeric purity. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3291–3294. [[CrossRef](#)]
23. Hodgkinson, J.T.; Galloway, W.R.J.D.; Wright, M.; Mati, I.K.; Nicholson, R.L.; Welch, M.; Spring, D.R. Design, synthesis and biological evaluation of non-natural modulators of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kanchanabancha, C.; Tao, W.; Hong, H.; Liu, Y.; Hahn, F.; Samborsky, M.; Deng, Z.; Sun, Y.; Leadlay, P.F. Unusual acetylation-elimination in the formation of tetrionate antibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5785–5788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Baker, Y.R.; Galloway, W.R.J.D.; Hodgkinson, J.T.; Spring, D.R. Design and synthesis of a biotinylated chemical probe for detecting the molecular targets of an inhibitor of the production of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin. *Molecules* **2013**, *18*, 11783–11796. [[CrossRef](#)]
26. Giddens, A.C. Studies of biologically active natural products—Texaline, Pseudopyronines A and B, and Varacin. Ph.D. Thesis, The University of Auckland, Auckland, New Zealand, 2008.
27. Chhabra, S.R.; Harty, C.; Hooi, D.S.W.; Daykin, M.; Williams, P.; Telford, G.; Pritchard, D.I.; Bycroft, B.W. Synthetic Analogues of the Bacterial Signal (Quorum Sensing) Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 97–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Losa, D.; Köhler, T.; Bacchetta, M.; Saab, J.B.; Frieden, M.; van Delden, C.; Chanson, M. Airway epithelial cell integrity protects from cytotoxicity of *pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signals. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2015**, *53*, 265–275. [[CrossRef](#)]
29. Williams, S.C.; Patterson, E.K.; Carty, N.L.; Griswold, J.A.; Hamood, A.N.; Rumbaugh, K.P. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 2281–2287. [[CrossRef](#)]
30. Ritchie, A.J.; Whittall, C.; Lazenby, J.J.; Chhabra, S.R.; Pritchard, D.I.; Cooley, M.A. The immunomodulatory *Pseudomonas aeruginosa* signalling molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone enters mammalian cells in an unregulated fashion. *Immunol. Cell Biol.* **2007**, *85*, 596–602. [[CrossRef](#)]
31. Precourt, L.-P.; Seidman, E.; Delvin, E.; Amre, D.; Deslandres, C.; Dominguez, M.; Sinnett, D.; Levy, E. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 1628–1637. [[CrossRef](#)]
32. Camps, J.; Pujol, I.; Ballester, F.; Joven, J.; Simó, J.M. Paraoxonases as potential antibiofilm agents: Their relationship with quorum-sensing signals in Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1325–1331. [[CrossRef](#)]
33. Gonzalvo, M.C.; Gil, F.; Hernandez, A.F.; Rodrigo, L.; Villanueva, E.; Pla, A. Human liver paraoxonase (PON1): Subcellular distribution and characterization. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **1998**, *12*, 61–69. [[CrossRef](#)]
34. Ng, C.J.; Wadleigh, D.J.; Gangopadhyay, A.; Hama, S.; Grijalva, V.R.; Navab, M.; Fogelman, A.M.; Reddy, S.T. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44444–44449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Teiber, J.F.; Horke, S.; Haines, D.C.; Chowdhary, P.K.; Xiao, J.; Kramer, G.L.; Haley, R.W.; Draganov, D.I. Dominant Role of Paraoxonases in Inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 2512–2519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kravchenko, V.V.; Kaufmann, G.F.; Mathison, J.C.; Scott, D.A.; Katz, A.Z.; Wood, M.R.; Brogan, A.P.; Lehmann, M.; Mee, J.M.; Iwata, K.; et al. N-(3-Oxo-acyl)homoserine Lactones Signal Cell Activation through a Mechanism distinct from the canonical pathogen-associated molecular pattern recognition receptor pathways. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 28822–28830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Horke, S.; Xiao, J.; Schütz, E.-M.; Kramer, G.L.; Wilgenbus, P.; Witte, I.; Selbach, M.; Teiber, J.F. Novel paraoxonase 2-dependent mechanism mediating the biological effects of the *pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-Oxo-Dodecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 3369–3380. [[CrossRef](#)]

38. Tao, S.; Luo, Y.; He, B.; Liu, J.; Qian, X.; Ni, Y.; Zhao, R. 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*. [[CrossRef](#)]
39. Zhao, G.; Neely, A.M.; Schwarzer, C.; Lu, H.; Whitt, A.G.; Stivers, N.S.; Burlison, J.A.; White, C.; Machen, T.E.; Li, C. N-(3-oxo-acyl) homoserine lactone inhibits tumor growth independent of Bcl-2 proteins. *Oncotarget* **2016**, *7*, 5924–5942. [[CrossRef](#)]
40. Erickson, D.L.; Nsereko, V.L.; Morgavi, D.P.; Selinger, L.B.; Rode, L.M.; Beauchemin, K.A. Evidence of quorum sensing in the rumen ecosystem: Detection of N -acyl homoserine lactone autoinducers in ruminal contents. *Can. J. Microbiol.* **2002**, *48*, 374–378. [[CrossRef](#)]
41. Charlton, T.S.; Nys, R.D.; Netting, A.; Kumar, N.; Hentzer, M.; Givskov, M.; Kjelleberg, S. 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. *Environ. Microbiol.* **2000**, *2*, 530–541. [[CrossRef](#)]
42. Pearson, J.P.; Gray, K.M.; Passador, L.; Tucker, K.D.; Eberhard, A.; Iglewski, B.H.; Greenberg, E.P. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 197–201. [[CrossRef](#)]
43. Horikawa, M.; Tateda, K.; Tuzuki, E.; Ishii, Y.; Ueda, C.; Takabatake, T.; Miyairi, S.; Yamaguchi, K.; Ishiguro, M. Synthesis of *Pseudomonas* quorum-sensing autoinducer analogs and structural entities required for induction of apoptosis in macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2130–2133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. McCready, A.R.; Paczkowski, J.E.; Henke, B.R.; Bassler, B.L. Structural determinants driving homoserine lactone ligand selection in the *Pseudomonas aeruginosa* LasR quorum-sensing receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 245–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kline, T.; Bowman, J.; Iglewski, B.H.; de Kievit, T.; Kakai, Y.; Passador, L. Novel synthetic analogs of the *Pseudomonas* autoinducer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3447–3452. [[CrossRef](#)]
46. Smith, K.M.; Bu, Y.; Suga, H. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 81–89. [[CrossRef](#)]
47. Morkunas, B.; Galloway, W.R.J.D.; Wright, M.; Ibbeson, B.M.; Hodgkinson, J.T.; O’Connell, K.M.G.; Bartolucci, N.; Valle, M.D.; Welch, M.; Spring, D.R. Inhibition of the production of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin in wild-type cells by quorum sensing autoinducer-mimics. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8452. [[CrossRef](#)]
48. Kim, C.; Kim, J.; Park, H.-Y.; Lee, J.-H.; Park, H.-J.; Kim, C.K.; Yoon, J. Structural understanding of quorum-sensing inhibitors by molecular modeling study in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 1095–1103. [[CrossRef](#)]
49. Jadhav, G.P.; Chhabra, S.R.; Telford, G.; Hooi, D.S.W.; Righetti, K.; Williams, P.; Kellam, B.; Pritchard, D.I.; Fischer, P.M. Immunosuppressive but non-LasR-inducing analogues of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3348–3359. [[CrossRef](#)]
50. Maurer, S.; Wabnitz, G.H.; Kahle, N.A.; Stegmaier, S.; Prior, B.; Giese, T.; Gaida, M.M.; Samstag, Y.; Hänsch, G.M. 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*. [[CrossRef](#)]
51. Karlsson, T.; Turkina, M.V.; Yakymenko, O.; Magnusson, K.-E.; Vikström, E. The *Pseudomonas aeruginosa* N-Acylhomoserine Lactone Quorum Sensing Molecules Target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002953. [[CrossRef](#)]
52. Thomas, G.L.; Böhner, C.M.; Williams, H.E.; Walsh, C.M.; Ladlow, M.; Welch, M.; Bryant, C.E.; Spring, D.R. Immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing small molecule probes on mammalian macrophages. *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 132–137. [[CrossRef](#)]
53. Biswas, N.N.; Kutty, S.K.; Barraud, N.; Iskander, G.M.; Griffith, R.; Rice, S.A.; Willcox, M.; Black, D.S.; Kumar, N. Indole-based novel small molecules for the modulation of bacterial signalling pathways. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 925–937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Pinto, A.; Ciesla, J.H.; Palucci, A.; Sutliff, B.P.; Nomura, C.T. Chemically Intractable No More: In Vivo Incorporation of “Click”-ready fatty acids into poly-[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *escherichia coli*. *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 215–219. [[CrossRef](#)]

55. Quorum Sensing. In *Methods in Molecular Biology*; Rumbaugh, K.P. (Ed.) Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2011; Volume 692, ISBN 978-1-60761-970-3.
56. Murray, E.J.; Crowley, R.C.; Truman, A.; Clarke, S.R.; Cottam, J.A.; Jadhav, G.P.; Steele, V.R.; O'Shea, P.; Lindholm, C.; Cockayne, A.; et al. Targeting staphylococcus aureus quorum sensing with nonpeptidic small molecule inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2813–2819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kaufmann, G.F.; Sartorio, R.; Lee, S.-H.; Rogers, C.J.; Meijler, M.M.; Moss, J.A.; Clapham, B.; Brogan, A.P.; Dickerson, T.J.; Janda, K.D. Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 309–314. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Name of journal: World Journal of gastroenterology

Manuscript NO: 65811

Manuscript type: REVIEW

Gossip in the gut: Quorum sensing, a new player in host-microbiota interactions

Coquant G, Aguanno D *et al.* *Quorum Sensing in host-microbiota interactions*

Garance Coquant¹, Doriane Aguanno¹, Sandrine Pham, Nathan Grellier, Sophie Thenet, Véronique Carrière, Jean-Pierre Grill, Philippe Seksik

¹ **the authors contributed equally to the work**

Institutions

Garance Coquant, Sorbonne Université, Centre de recherche Saint-Antoine, INSERM, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Microbiote Intestin et Inflammation, Paris, 75012 France.

Doriane Aguanno, Sorbonne Université, Centre de recherche Saint-Antoine, INSERM, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Microbiote Intestin et Inflammation, Paris, 75012 France ; EPHE, PSL University, Paris, 75014, France

Sandrine Pham, Sorbonne Université, Centre de recherche Saint-Antoine, INSERM, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Microbiote Intestin et Inflammation, Paris, 75012 France ; EPHE, PSL University, Paris, 75014, France

Nathan Grellier, Sorbonne Université, Centre de recherche Saint-Antoine, INSERM, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Microbiote Intestin et Inflammation, Paris, 75012 France.

Sophie Thenet, Sorbonne Université, Centre de recherche Saint-Antoine, INSERM, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Microbiote Intestin et Inflammation, Paris, 75012 France ; EPHE, PSL University, Paris, 75014, France

Véronique Carrière, Sorbonne Université, Centre de recherche Saint-Antoine, INSERM, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Microbiote Intestin et Inflammation, Paris, 75012 France.

Jean-Pierre Grill, Sorbonne Université, Centre de recherche Saint-Antoine, INSERM, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Microbiote Intestin et Inflammation, Paris, 75012 France.

Philippe Seksik, Sorbonne Université, Centre de recherche Saint-Antoine, INSERM, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Microbiote Intestin et Inflammation, Paris, 75012 France ; Service de gastroentérologie et nutrition, Hôpital Saint-Antoine, APHP, Paris, 75012, France.

ORCID numbers

Garance Coquant <https://orcid.org/0000-0002-4422-8483>

Doriane Aguanno <https://orcid.org/0000-0002-4154-3592>

Nathan Grellier : <https://orcid.org/0000-0002-0452-3218>

Sophie Thenet <https://orcid.org/0000-0002-0336-2942>

Véronique Carrière : <https://orcid.org/0000-0002-6263-0847>

Philippe Seksik : <https://orcid.org/0000-0003-3596-9893>

Supported by:

This research was funded by Fondation pour la Recherche Médicale, grant number EQU202003010171 and by Association François Aupetit (projects research on AHLs 2019 and 2021). G. Coquant was the recipient of a fellowship from Fondation pour la Recherche Médical FRM ECO201806006843. D. Aguanno was the recipient of a

fellowship from CORDDIM, Ile-de-France region. The authors acknowledge the Association François Aupetit for its unwavering support.

Corresponding author: Philippe SEKSIK, MD, PhD, Service de gastroentérologie et nutrition, Hôpital Saint-Antoine, APHP, Paris, 75012, France, philippe.seksik@sat.aphp.fr

Abstract

Bacteria are known to communicate with each other and regulate their activities in social networks by secreting and sensing signaling molecules called autoinducers, a process known as quorum sensing (QS). This is a growing area of research in which we are expanding our understanding of how bacteria collectively modify their behavior but are also involved in the crosstalk between the host and gut microbiomes. This is particularly relevant in the case of pathologies associated with dysbiosis or disorders of the intestinal ecosystem. This review will examine the different QS systems and the evidence for their presence in the intestinal ecosystem. We will also provide clues on the role of QS molecules that may exert, directly or indirectly through their bacterial gossip, an influence on intestinal epithelial barrier function, intestinal inflammation, and intestinal carcinogenesis. This review aims to provide evidence on the role of QS molecules in gut physiology and the potential shared by this new player. Better understanding the impact of intestinal bacterial social networks and ultimately developing new therapeutic strategies to control intestinal disorders remains a challenge that needs to be addressed in the future.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease; Quorum Sensing; gut microbiota; Dysbiosis; Inflammation; Intestinal barrier

Core tip:

Host-microbiota interactions play a crucial role in the pathophysiology of many intestinal diseases. While biological components have been repeatedly described, a largely overlooked component is quorum sensing (QS), a density-dependent system able to coordinate bacterial responses and interact with host cells constantly exposed to bacteria. This review intends to describe the different QS systems to show evidence that QS is part of the intestinal ecosystem and highlight its impact on intestinal epithelial barrier function, inflammation, and intestinal carcinogenesis. From this report, we open up a new area of intestinal physiology.

INTRODUCTION

Gut microbiota mutually interacts with coevolved host epithelial and immune cells in a beneficial reciprocal relationship^[1]. The advent of multi-omics sequencing in the past decade has allowed researchers to investigate the complexity of the intestinal microbiota in various human disorders^[2]. Many lines of evidence support a role for alteration of gut microbiota (dysbiosis) in the development or perpetuation of inflammatory and metabolic disorders; recent data pointed out the consequences of dysbiosis on host-microbiota interactions in this setting^[3, 4]. Currently, gut microbiota metabolites recognized as the main drivers of the impact of gut microbiota on hosts are short-chain fatty acids, branched-chain amino acids, trimethylamine N-oxide, bile acids, tryptophan, and indole derivatives^[3, 5]. A largely overlooked component is diffusible signaling molecules, which modulate the physiological response in the three domains of life^[6]. A particular class of these signaling compounds is represented by bacterial quorum sensing molecules called autoinducers (AIs). Quorum sensing (QS) is a density-dependent mechanism allowing bacterial populations to coordinate gene expression and physiology by modulating, for example, metabolic pathways, secretion of virulence factors, or biofilm formation in response to AI^[7]. Drawing on its density-dependent nature, it can be hypothesized that the production of bacterial signaling molecules is abundant in the highly densely populated environment of the mammalian intestinal tract.

Moreover, since several eukaryotic systems from fungi to plants and animals are known to recognize and respond to bacterial signaling compounds, it seems likely that human intestinal cells constantly exposed to bacterial compounds might also have developed response mechanisms to AI with consequences on intestinal physiology^[8]. The purpose of this current review is to provide clues to consider bacterial QS as a new actor of host-microbiota interactions. We will start by presenting the bacterial QS systems and evidence of QS in the gut. We will then provide an overview of the impact of QS molecules on host cell functions within the gut. Finally, we will investigate how modulation of the QS could be thought of as a therapeutic option, determine the key challenges, and suggest directions for future QS research.

I- QUORUM SENSING: GOSSIP IN A BACTERIAL WORLD

In the conventional view of prokaryotic existence, bacteria live as unicellular organisms, with responses to external stimuli limited to detecting chemical and physical signals of environmental origin. This view of bacteriology is now recognized as overly simplistic because bacteria communicate through small 'hormone-like' organic compounds. QS is a bacterial cell-cell communication process that involves the production, detection, and response to extracellular signaling molecules called AI. AI enables bacteria to perceive and respond to temporal and contiguous environments and coordinates the behavior of colonies by altering gene expression. QS controls genes that direct beneficial activities when performed by groups of bacteria acting in synchrony. Processes controlled by QS include bioluminescence, sporulation, competence, antibiotic production, biofilm formation, and virulence factor secretion (Figure 1A). Similar to languages between humans, these signals vary between species. Some bacterial species can interpret many different signals, while others respond to a few. The first such system was described in 1979 in *Vibrio fischeri*^[9], a symbiotic species that provides marine eukaryotic hosts with light. Light emission depends on transcription of the luciferase operon, which occurs when the cell population density is sufficient to produce a threshold accumulation of a secreted AI, a specific N-acyl Homoserine Lactone (AHL). It was only in 1994 that the term quorum sensing was first used to introduce the idea of a minimal population (quorum) that was needed to trigger a group behavior thanks to a signal^[10]. The science of studying group behavior in microorganisms has even been named "sociomicrobiology" ^[11].

1.1 Different ways of talking

Bacterial quorum sensing is highly complex and mediates communications thanks to the diversity of its different systems. QS systems can be divided into systems specific to species and mediating communication between (i) Gram-positive bacteria, (ii) Gram-negative bacteria, and (iii) interspecies systems (Table 1 and Figure 1).

QS in Gram-positive species is driven in most cases by 5–17 amino acid oligopeptides (AIPs for AutoInducer Peptides), which are detected by membrane receptors belonging to the histidine kinase family and are involved in virulence or

competence^[12]. In addition, γ -butyrolactones are produced and integrated by *Streptomyces* sp. as signals controlling antibiotic production^[13] or metabolism^[14].

QS in Gram-negative bacteria relies on a high diversity of different systems, with some bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), possessing several QS systems (Table 1). The expression of over 300 genes is regulated by QS. The most common system is driven by AI-1 molecules belonging to the AHL family, which are constituted by a homoserine lactone ring carrying a 4–18 carbon acyl chain. The lengths and modifications of the acyl chain give each AHL its species specificity^[15]. The first described model is the *Vibrio fischeri* system, in which N-3-oxohexanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C6) is synthesized by LuxI synthase and passively diffuses out of the cell and enters another bacterium in which it binds its receptor LuxR^[16] (Figure 1B). Above a threshold, the AHL/receptor binds a consensus DNA sequence, thus triggering luciferase expression^[17]. This model applies to all AHL systems (Table 1 and Figure 1B). The system involves a positive feedback loop, thus promoting QS activation at the population scale (Figure 1B). To date, numerous homologous systems (*i.e.*, genes coding synthases and receptors) have been described in many gram-negative bacteria, including over 70 Proteobacteria species^[18] (Table 1).

Other Gram-negative QS systems involve the AI-3 molecule, initially identified in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype O157:H7^[19]. AI-3 regulates flagellar genes and pathogenicity^[20, 21] and is thought to be present in other enteropathogens (Table 1). A recent study^[22] uncovered the structure of AI-3 and its natural analogs, including the prominent analog in mouse feces *in vivo*, which belongs to the pyrazinone family. The authors showed that various gram-negative and Gram-positive bacteria produce AI-3 analogs, thus redefining the specificity of AI-3 molecules.

Last, the third type of QS system has been identified in Gram-negative bacteria such as EHEC or *Vibrio* species and Gram-positive bacteria such as *Salmonella enterica*^[23, 24]. It relies on AI-2 molecules such as S-THMF-borate (for (2S,4S)-2-methyl-2,3,3',4'-tetrahydroxy-tetrahydrofuran-borate)^[25] and R-THMF (for (2R,4S)-2-methyl-2,3,3',4'-tetrahydroxy-tetrahydro furane)^[26]. AI-2 has now been found in various bacterial species in which it regulates many processes^[27] and is proposed to mediate poly-species communication (Figure 1C).

In addition, indole is produced from tryptophan (Trp) by Gram-negative and Gram-positive commensal and pathogenic bacteria displaying tryptophanase activity^[28-31]. As the source of tryptophan is supplied by the diet and cannot be synthesized endogenously, either by bacteria or by the host, indole is a bacterial byproduct of Trp metabolism. However, in recent years, some authors have considered indole to be a QS molecule, as it is produced in a density-dependent manner and regulates several bacterial physiological processes, such as the formation of spores or biofilms, virulence traits, bacterial motility, and drug resistance^[29, 32, 33].

The versatility of QS systems and their autoinducer molecules highlights the complexity of communication and thus emphasizes the key role QS could play in a diverse ecosystem: the intestinal microbiota.

1.2 Quorum sensing in the gut

The study of QS in the gut is still a relatively recent matter of interest, as QS is generally addressed from the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* point of view in the lung ecosystem. However, many arguments suggest that QS is a new player in the gut ecosystem.

1.2.1 AHLs in the gut

As part of the eavesdropping mechanism, some bacteria from the human gut can sense AHLs from other species (Figure 1A). Gram-negative bacilli such as *E. coli*, *Enterobacter*, or *Klebsiella* express the receptor SdiA, which can sense AHL, without producing such a signal^[34]. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, which targets the digestive tract in severely immune-compromised patients^[35, 36], and the more common enteropathogen *Yersinia enterocolitica* are known to produce AHLs^[37]. Analyses from sequencing databases have shown the presence of LuxI/LuxR homologs in a few commensals: *Hafnia alvei*, *Edwardsiella tarda*, and *Ralstonia* sp. strain 5_7_47FAA^[37]. However, the latter article did not demonstrate the presence of AHLs but only homologs of the genes coding for the synthase complex and the receptor. A cohort low sample size pediatric study (n=4) demonstrated, thanks to bacterial reporter systems, the presence of AHLs in the feces of patients without identifying them^[38]. Our team investigated the question of AHLs in the human gut in the context

of inflammatory bowel disease (IBD). With high-resolution mass spectrometry, we identified approximately ten AHLs in the feces of healthy patients, IBD patients in remission, and flare^[39]. We also found a never-described AHL, 3-oxo-C12:2-HSL, that was less represented in IBD patients, especially in flares than in healthy subjects^[39].

I.2.2. AI-2 in the gut

AI-2 presence in the gut has been reported by several articles ^[19, 40, 41] but is mainly linked to pathogenic bacteria such as enterohemorrhagic *E. coli*^[19]. As AI-2 is considered a “universal language”, it is not surprising to find this AI in an ecosystem as diverse as the gut microbiota.

Thompson *et al.* showed that most Firmicutes contain LuxS protein orthologs, an important enzyme that allows AI-2 production^[42]. In contrast, its presence is less represented in Bacteroidetes. Mutant *E. coli* engineered to regulate AI-2 levels in the mouse gut counteract antibiotic-induced dysbiosis^[42]. AI-2 produced by *E. coli* benefits Firmicutes while restraining Bacteroidetes representation^[42], suggesting an important role of AI-2 in the gut ecosystem.

I.2.3. Other QS signals

Concerning other QS signals, there is less proof of their implications in gut microbiota. A recent study showed a correlation between indole and *Clostridioides difficile* infection (CDI) with higher indole concentrations for patients with CDI than for CDI-negative patients with diarrhea^[43]. *C. difficile* induces indole production through overexpression of the tryptophanase gene *tnaA* in enterotoxigenic *E. coli* and other indole-producing anaerobes. This increased indole level has been shown to be detrimental to some of the beneficial bacteria and favors *C. difficile* colonization.

These mechanisms collectively suggest a complex QS network between bacteria in the gut ecosystem. The key issue is now to decode every language to fully understand its potential in host-microbiota interactions.

I.3 Gossip in the gut: direct dialog with the host and indirect effects through bacterial behavior

In an ecosystem as networked and complex as that in the gut, bacterial communication has to be seen from a large perspective, with multiple bacterial populations crosstalking to each other through eavesdropping or crosstalking between species (Figure 1A). Therefore, the question of how QS affects the host can be addressed in two ways (Figure 2).

QS modulates microorganism metabolism, which in turn can affect the host's physiology; one could consider this to be an indirect effect of QS molecules on the host (Figure 2). Bacterial metabolism modifies beneficial byproducts such as short-chain fatty acids (SCFAs) and bile acids^[42]. By modulating intestinal microbiota composition, QS can indirectly influence gut physiology by promoting deleterious or beneficial bacteria (Figure 2). Thompson *et al.* demonstrated that AI-2 modulates dysbiotic microbiota composition by enhancing Firmicutes growth^[42]. Several reports *in vitro* and *in vivo* describe how enteropathogens can signal through QS to commensals and trigger the expression of toxins, virulence factors, and biofilm formation^[44-46]. In addition, AI-3 controls the genes that enable enterohemorrhagic *Escherichia coli* to cause lesions by the attachment and effacing process^[19].

The question addressed in this review is how quorum-sensing molecules can directly affect the host, independent of the producing bacteria (Figure 2).

II- HOST: "YOU'VE GOT MAIL"

As discussed above, it remains largely unknown how the microbial communities hosted in the gut lumen use quorum sensing communication systems. However, there is evidence that at least several bacterial species commonly found in the gastrointestinal tract have the capacity to synthesize QS molecules^[6, 8, 39].

Studies on the impact of QS molecules on the biology of intestinal host cells have focused on key actors of barrier function and the immune response. Intestinal barrier function includes the ability of epithelial cells to form (i) a selective barrier whose permeability is controlled by cell-cell junctions^[47], (ii) synthesize a protective mucus layer and antimicrobial peptides^[48, 49], and (iii) secrete cytokines and chemokines

allowing appropriate crosstalk with the underlying immune compartment. The intestinal immune system is involved in tolerogenic or inflammatory responses to the commensal microbiota or pathobionts/pathogens^[50, 51], and it represents the largest immune organ in the body. Intestinal epithelial cells, intraepithelial lymphocytes, and immune cells located in the lamina propria are involved in the modulation of immunity and inflammation by microbiota^[52].

The impact of QS molecules on barrier function and the immune response has been mainly studied in the context of host-pathogen interactions, probably because most of the data rely on AHLs produced by *P. aeruginosa*. However, evidence of the presence of QS molecules in the healthy intestinal lumen has led to further study on their effects on the host compartment, including barrier function, inflammatory process, and carcinogenesis.

II.1 Effects of quorum-sensing molecules on intestinal epithelial barrier function

II.1.1. Acyl Homoserine Lactones

3-oxo-C12-HSL produced by *P. aeruginosa* is probably the QS molecule whose effects on the barrier function of epithelial cells have been the most studied during the last two decades^[53]. *P. aeruginosa* synthesizes various virulence factors, which act synergistically with QS molecules to destabilize cell-cell junctions and promote bacterial transmigration across epithelial and endothelial barriers^[54].

3-oxo-C12-HSL induces an increase in paracellular permeability to ions and macromolecules^[55-60] (Table 2). This deleterious effect of 3-oxo-C12-HSL on barrier function is accompanied by an alteration of tight junctions (TJs) (Figure 3). In the Caco-2 intestinal epithelial cell line, 3-oxo-C12-HSL induced a decrease in the expression, as well as mislocalization, of the TJ proteins occludin, tricellulin, ZO-1, ZO-3, JAM-A, and of the adherent junction proteins E-cadherin and β -catenin ^[55, 58-61] (Table 2). Loss of occludin/ZO-1 and tricellulin/ZO-1 interaction at the plasma membrane suggested the dismantling of TJ protein complexes^[61]. In addition, hyperphosphorylation of occludin, ZO-1, ZO-3, JAM-A, E-cadherin, and β -catenin on tyrosine residues (as well as serine and threonine for E-cadherin and ZO-1) was reported in the presence of 3-

oxo-C12-HSL, whereas the serine and threonine residues of occludin, JAM-A and β -catenin were less phosphorylated^[58, 59].

Several signaling mechanisms, including p38 and p42/44 MAP kinases^[59] ^[60], Ca^{2+} release^[57, 58], matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-3 via protease-activated receptor (PAR) signaling^[55] and oxidative stress^[62], have been implicated in 3-oxo-C12-HSL effects on junctional proteins and on the concomitant increase in permeability (Table 2).

As discussed above, the most prominent AHL detected in the human intestinal ecosystem is unsaturated 3-oxo-C12:2-HSL^[39]. Despite a high structural homology with the *P. aeruginosa* 3-oxo-C12-HSL, this intestinal AHL has recently been found to have opposite properties concerning barrier function (Table 2). In contrast to 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C12:2-HSL does not increase paracellular permeability in Caco-2/TC7 enterocytic cells^[39, 61]. Most importantly, 3-oxo-C12:2-HSL can limit TJ disruption induced by the proinflammatory cytokines interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α)^[61] (Figure 3). In these conditions mimicking intestinal inflammation encountered, for example, in IBD, 3-oxo-C12:2-HSL maintains the interaction of the TJ transmembrane proteins occludin and tricellulin with their main cytoplasmic partner ZO-1. It limits cytokine-induced occludin and tricellulin ubiquitination and the interaction of these TJ proteins with the E3 ubiquitin ligase itch, suggesting stabilization of TJ complexes at the plasma membrane in inflammatory conditions. Altogether, these results show that “commensal” intestinal 3-oxo-C12:2-HSL mitigates the deleterious effects of the inflammatory environment on TJs, which are key actors in epithelial barrier function^[61].

Epithelial barrier disruption may combine TJ alteration and an unrestricted passage, which occurs following epithelial damage, generated, for example, by cell apoptosis upon exposure to harmful molecules such as high doses of proinflammatory cytokines^[63-65]. This TJ-independent breaking of the barrier allows translocation of large particles such as large proteins, entire bacteria, and viruses, which *a priori* cannot cross the epithelium through the paracellular route even in conditions where TJs are “open”^[66]. The 3-oxo-C12-HSL produced by *P. aeruginosa* exerts cytotoxic effects,

particularly through apoptosis induction, in numerous cell types, including the intestinal and colonic epithelial cell lines LS174T^[67-69], Caco-2^[70], and CT26^[62] (Table 2 and Figure 3). Apoptosis triggered by 3-oxo-C12-HSL relies on oxidative stress and caspase-dependent processes^[62, 69], whereas short-chain C4-HSL does not exert any apoptotic effects^[67]. Interestingly, the increase in paracellular permeability to macromolecules induced by 3-oxo-C12-HSL was dramatically exacerbated in Caco-2/TC7 cells cultured in the presence of IFN- γ and TNF- α or cocultured with THP-1 activated monocytic cells^[61]. These synergistic effects on barrier disruption probably rely on epithelial cell apoptosis, as they are abolished by a caspase inhibitor (unpublished results). In contrast, intestinal AHL 3-oxo-C12:2-HSL neither exerts cytotoxic effects nor synergizes with proinflammatory cytokines to disrupt the epithelial barrier^[61].

Epithelial injury accompanying acute inflammatory conditions is followed by a re-epithelialization phase, during which cell migration plays an important role^[71]. Interestingly, 3-oxo-C12-HSL has been shown to dose-dependently modulate Caco-2 cell migration in a wound-healing assay and interact directly with the GTPase activating protein IQGAP1 stressing a potential role of AHL in cytoskeletal reorganization ^[72] (Table 2).

Another key actor of the intestinal physical barrier is the mucus layer, which is essential to maintain segregation between luminal microorganisms and the epithelium^[49]. 3-oxo-C12-HSL induces reduced expression and production of Mucin 2 in LS174T cells^[67], as well as a decrease in the levels of MUC3 mRNA in the Caco-2 cell line cultivated in an undifferentiated state^[70] (Table 2 and Figure 3). Interestingly, differentiated Caco-2 cells, which express higher levels of mucin 3, showed less sensitivity to 3-oxo-C12-HSL-induced apoptosis in the latter study, and the addition of mucin dose-dependently protected cells from apoptosis induced by this AHL^[70].

It must be specified that all these studies on barrier function were carried out with high concentrations of AHLs (100–400 μ M) (Table 2), knowing that the concentration of 3-oxo-C12-HSL has been estimated to reach 600 μ M in biofilms of *P. aeruginosa*^[73].

II.1.2 Gram-positive quorum sensing peptides

The effects of AIP (Gram-positive bacteria) on intestinal barrier function are much less documented than those of Gram-negative QS. Whereas most of the studies on the effects of AIP on host inflammation describe the indirect effects of AI through the modulation of bacterial metabolism, one article reported the direct effects of AIP. Fujiya *et al.* [74] reported that *Bacillus subtilis* AIP, named competence and sporulation factor (CSF), induces heat shock protein-27 (HSP27) expression and the p38/MAPK pathway and reduces cell death and the loss of the epithelial barrier induced by oxidative stress (Table 2 and Figure 3). Inducible HSPs are needed under stress and help stabilize proteins to prevent denaturation[75]. *B. subtilis* is part of the normal microbiota; it is also used as a commercial probiotic and is beneficial to the host. Moreover, CSF seems to signal through a receptor named OCTN2 (organic cation/carnitine transporter 2), and polymorphisms of this gene's receptor are part of the susceptibility locus of Crohn's disease[74].

II.1.3 Indole

Indole exerts a beneficial role on TJ protein expression in several intestinal epithelial cells [76-79] (Table 2). Oral administration of indole to germ-free mice, which display very low indole fecal levels, increased the expression of tight junction and adherens junction-associated proteins in the colonic epithelium and improved their resistance to dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis[77]. Indole has been identified as an endogenous agonist of aryl hydrocarbon receptor (AhR), which can compete for receptor binding with well-known AhR ligands[80]; several studies have also stressed the key role of the AhR pathway in indole derivative protective effects[81-83]. Accordingly, several studies have shown that AhR activation strengthens the epithelial barrier by protecting TJs[82, 84-87] (Figure 3) or by stimulating antimicrobial peptide production via IL-22[88, 89].

II.2 Effects of Quorum Sensing molecules on immune response

In addition to their effects on the intestinal barrier, QS molecules were analyzed on different actors of the immune compartment of the intestine, which is involved in

complex crosstalk with the epithelial compartment to maintain an appropriate immune response toward the content of the intestinal lumen.

II.2.1 AHLs

Our group described that 3-oxo-C12:2-HSL, an AHL recently discovered in the human gut^[39], exerts anti-inflammatory effects on intestinal epithelial cells. Intestinal epithelial cells can secrete some cytokines, among which the chemokine IL-8 promotes the recruitment of neutrophils in the mucosa and participates in **the acute-phase response** ^[90, 91]. In a study comparing the effect of 3-oxo-C12:2-HSL to 3-oxo-C12-HSL produced by *P. aeruginosa*, our group demonstrated in the human enterocytic Caco-2/TC7 cell line that 3-oxo-C12:2-HSL, but not 3-oxo-C12-HSL, attenuated the induction of IL-8 secretion induced by the proinflammatory cytokine IL-1 β ^[39, 92] (Table 3 and Figure 3). This potential anti-inflammatory effect of 3-oxo-C12:2-HSL is consistent with the hypothesis of a beneficial role of this AHL in gut ecosystems^[39], **similarly to its protective effects on TJ integrity described above**. The impact of intestinal 3-oxo-C12:2-HSL on immune cells remains largely unknown.

The effects of 3-oxo-C12-HSL depend on the concentration and cell type studied^[6, 93]. Telford *et al.*^[94] showed that 3-oxo-C12-HSL inhibits the production of TNF- α and IL-12 (a cytokine involved in the T helper cell-1 type response (Th1-type response)) by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages at high concentrations and stimulates the production of antibodies, particularly immunoglobulin G1 (IgG1), which is an indicator of a Th2-type response at lower concentrations (Table 3). Conversely, Smith *et al.*^[95] showed that 3-oxo-C12-HSL activates and promotes the differentiation of naive T lymphocytes toward a Th1-like phenotype, while Ritchie *et al.*^[96] observed that 3-oxo-C12-HSL inhibits the differentiation of both Th1 and Th2 T lymphocytes (Table 3). Altogether, these results demonstrated that 3-oxo-C12-HSL is an immunomodulator of the Th1/Th2 response. 3-oxo-C12-HSL and two other QS molecules from *P. aeruginosa*, PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), and HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline), suppress both innate and adaptive immune responses acting on lymphoid cells, dendritic cells, and neutrophil monocytes/macrophages^[22, 97, 98]. 3-oxo-C12-HSL and PQS decreased the production of the cytokines IL-12 and IFN- γ by activated dendritic cells, which in turn decreased T-cell proliferation and

activity^[98-100] while promoting the induction of regulatory T-cells^[99] (Table 3). 3-oxo-C12-HSL provoked apoptosis of macrophages, neutrophils, and T lymphocytes through activation of caspases and the mitochondrial apoptosis pathway^[101, 102]. Several reports described inhibition of the nuclear factor-kappa B (NF-κB) pathway by QS molecules from *P. aeruginosa*^[93, 103-106] and/or the activation of signaling pathways such as p38 MAPK^[105, 107] (Table 3). It has been recently demonstrated that only long-chain AHLs such as 3-oxo-C12-HSL modulate the phenotype of dendritic cells and the type 2 immune response through mechanisms involving retinoic acid signaling and the protein kinase AKT^[106].

The molecular mechanisms involved in the effects of QS molecules from *P. aeruginosa* on immune cells are independent of the Toll-like receptor pathway^[105], which is a classical cell process involved in recognizing pathogen fragments. Some reports have indicated that the perception of AHL by mammalian cells involves the bitter taste receptor T2R38^[108-110], which is widely expressed in the human digestive tract from the tongue to the colon^[111]. Polymorphisms in the *TAS2R38* gene may increase susceptibility to infections and colorectal cancer^[112]. It has been shown that these receptors use inflammatory pathways, which differ according to the cell type and their localization^[113]. 3-oxo-C12-HSL binds to the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)^[114], which has been proposed as a potential receptor for AHL and seems to be involved in AHL proinflammatory effects^[115]. Recently, Moura-Alvez *et al.*^[116] showed that QS molecules produced by *P. aeruginosa* modulated the activity of the transcription factor AhR, which plays an important role in regulating innate and adaptive immunity^[117, 118].

Overall, it has been demonstrated that QS molecules from *P. aeruginosa* have an immunosuppressive effect, allowing the pathogen to evade the immune system during infection. It remains to be determined whether and by what mechanisms endogenous intestinal 3-oxo-C12:2-HSL participates in controlling intestinal immunity in health and diseases.

II.2.2 AI-2 and AI-3

AI-2 is produced by both Gram-negative and Gram-positive bacteria and is mainly studied for its role in bacteria-bacteria communication and the virulence of pathogenic

strains [8]. However, little is known about the effect of AI-2 on immune cells. In mice, AI-2 administration has no effect by itself on cytokine expression but aggravates lung inflammation during *P. aeruginosa* infection by interfering with QS molecules produced by this pathogen^[119]. In cultured macrophages, AI-2 induces the expression of several cytokines and chemokines as well as the expression of TNFSF9 (TNF superfamily member 9), a protein involved in the immune response^[41] (Figure 3).

The AI-3 system is mainly described in enterohemorrhagic *E. coli* and is therefore linked to the development of intestinal epithelial lesions, suggesting its proinflammatory activity^[120] (Table 3 and Figure 3). Indeed, AI-3 and its analogs increase IL-8 secretion by THP-1 monocytes^[22]. Given that the AI-3 structure has only been uncovered recently^[22], the direct effect of this molecule on the host is poorly known thus far. In addition, given that the AI-3 bacterial receptor can recognize host-synthesized epinephrine/norepinephrine (Figure 3), one could suggest that adrenergic receptors could recognize AI-3^[19]. However, it has been shown that AI-3 and its analogs do not activate or modulate adrenergic signaling^[22].

II.2.3 Gram-positive autoinducer peptides (AIP)

The effects of Gram-positive AIP bacteria on inflammation are much less documented than those of Gram-negative QS. Moreover, most of the studies on the effects of AIP on host inflammation describe the indirect effects of AI through the modulation of bacterial metabolism.

A study described that AIP could selectively cross intestinal epithelial cell Caco-2 cell monolayers^[121]. Additionally, it has been reported that AIP can cross the highly selective blood-brain barrier *in vivo*^[122]. **These processes seem to be peptide-specific:** *Clostridium acetobutylicum* AIP easily penetrates the blood-brain barrier, while *Streptococcus pneumoniae*'s AIP crosses poorly^[122]. This shows that small molecules such as autoinducers affect the host's physiology beyond the gastrointestinal tract. For instance, it has been described that AIP has various effects on muscle inflammation as part of the gut-muscle axis. De Spiegler *et al.* performed an extensive screening of 75 QS molecules on muscle cells. They demonstrated both pro- and anti-inflammatory effects of four peptides from the genera *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, and *Bacillus*, and some of those peptides have been described in the gut^[121].

II.2.4 Indole

Several studies have reported that indole exerts anti-inflammatory effects in the intestine and protects against pathogenic infection^[123] (Table 3). AhR, an important contributor to the maintenance of innate and adaptive immunity, drives most of these effects, particularly in the intestinal mucosa^[117, 118, 124].

Several reports have shown altered tryptophan metabolism in gut inflammation in humans and mice ^[81, 125-127]. A decrease in endogenous indole was observed in human feces from subjects with celiac disease or IBD^[127]. This was associated with a decrease in AhR activity in the intestinal mucosa. In parallel, an increase in tryptophan levels in the same samples suggested that the gut microbiota-dependent metabolism of tryptophan was altered^[127]. In mouse models of celiac disease and IBD, the implantation of indole-producing bacteria increases AhR activity and protects them from gut inflammation^[81]. Interestingly, Moura-Alvez *et al.* showed that 3-oxo-C12-HSL and HHQ had an inhibitory effect on AhR activity and could compete with well-known activators of AhR^[116]. This observation raises the question of potential competition between several QS molecules for AhR-dependent modulation of innate and adaptive immunity.

II.3 Effects of Quorum Sensing molecules on Carcinogenesis

There is growing evidence that gut microbiota dysbiosis plays a major role in colorectal cancer (CRC) development^[128]. Indeed, modifications of commensal gut microbiota in favor of opportunist bacteria promote intestinal inflammation, which is well known as a driver event in CRC onset^[129, 130]. Thus, the concept of the “bacterial driver-passenger model” highlights the crosstalk between host immunity and colonic microbiota^[131]. For example, some driver pathogens, such as *Bacteroides fragilis*, have been proposed to promote a strong Th17 inflammatory response^[132]. This proinflammatory microenvironment might favor colonization by opportunist pathogens such as *Fusobacterium spp.* Accordingly, *Fusobacteria*-dominant biofilms were associated with human CRC^[133-135]. Altogether, these findings support that polymicrobial interactions, and intercellular communications might play an important

role in CRC development^[136]. Nevertheless, how bacteria communicate with themselves and with the host during CRC remains poorly understood.

Recent findings provide new insights into the role of the QS molecule AI-2 in intercellular communication during CRC. First, the AI-2 concentration is increased in tumors compared to the surrounding normal tissue in human CRC^[41]. These levels also correlate with the progression of the disease according to the CRC TNM (tumor node and metastasis) score^[41]. Regarding the tumor immune microenvironment, the AI-2 concentration positively correlates with TNFSF9 expression, which is mainly expressed by tumor-associated macrophages, and negatively correlates with the CD4/CD8 ratio, suggesting that AI-2 associates with the antitumor response^[41]. At the molecular level, it was demonstrated that AI-2 induces *in vitro* M1 polarization of U987-derived macrophages through the TNFSF9 signaling pathway^[137]. These findings reveal that AI-2 could be an important factor linked to the immune tumor microenvironment and shed light on the role of the quorum-sensing system during CRC development and progression. Interestingly, mammalian epithelial cells are able to produce AI-2 analog molecules that mimic AI-2 effects (Figure 3), illustrating the complexity of bacteria-host crosstalk ^[45]. Thus, a better characterization of quorum sensing molecules involved in tumorigenesis might be an opportunity to improve our knowledge of the mechanisms underlying CRC development.

II.4 The Host strikes back to Quorum Sensing

Interkingdom signaling works in two ways, as host cells are able to counterattack the QS system using several strategies.

As described above, as part of AI-3 signaling, host hormones such as epinephrine and norepinephrine can be recognized by EHEC and lead to the expression of virulence genes^[19]. This AI-3/epinephrine/norepinephrine signaling is not restricted to EHEC, and the receptor QseC is also expressed, for example, by the intestinal pathogenic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium^[138] (Table 1). Recently, *in silico* analysis suggested that another catecholamine neurotransmitter, dopamine, can bind to QseC.

However, no effect *in vitro* was measured^[139]. This study of interkingdom signaling through hormones has been named “microbial endocrinology”^[140].

Interestingly, there is evidence that human epithelial cells can produce AI-2 mimicking molecules. The study was conducted on Caco-2 intestinal epithelial cells, and the authors showed that an AI-2 mimic is produced not only when cells are in contact with bacteria but also after tight junction disruption by calcium deprivation or DSS treatment^[45]. This emphasizes how much AI-2 is a universal language between Gram-positive and Gram-negative bacteria and the host (Figure 3).

Hosts have also developed defense tools against QS, leading to a mechanism named quorum quenching. Mammals can synthesize enzymes named paraoxonases (PONs) that hydrolyze the lactone ring of long-chain AHLs^[141] (Figure 3). There are three types of PONs (PON 1, PON2, PON3) that are highly conserved across species, and PON2 has greater activity on AHLs^[142]. It has been demonstrated that PON2 is more highly expressed in the human jejunum than in other parts of the intestine^[143]. Interestingly, PON1 and PON3 are expressed at lower levels in patients with Crohn’s disease and ulcerative colitis than in healthy subjects^[144]. A case-control study has also shown that carriage of the PON1 R192 allele in Ashkenazi Jewish may confer protection against the development of IBD. This allele was significantly less common among IBD Ashkenazi patients, with a significant odds ratio of 0.61^[145].

III- QUORUM SENSING IN THE GUT: FUTURE DIRECTIONS FOR THIS NEW PLAYER

III.1 Using QS to modulate gut microbiota: application in gut ecosystem disorders

Gut dysbiosis is an imbalance in the composition of microorganisms inside the digestive tract, especially described with bacteria. This dysregulation has been shown to be a preponderant risk factor in several digestive and extra digestive diseases^[146-149]. For example, in IBD and recurrent *C. difficile* infections, it is well known that the over- and underrepresentation of certain phyla can lead to a pathologic state^[150, 151]. Modulating the gut microbiota may be the key to treating or even preventing such diseases by restoring normobiosis. Fecal microbiota transplantation is now commonly used in the setting of *C. difficile* infections ^[152, 153]. However, the lack of standardization

and the safety and quality issues of this procedure call for the development of new strategies.

Theoretically, AHLs remain good candidates in this approach using natural molecules from QS to modulate microbiota composition and gut inflammation. As seen above, AHL signaling may involve different pathways that contribute to controlling intestinal inflammation, such as inhibition of NF- κ B, modulation, inhibition of MAPK activation, increase in regulatory T cell induction, decrease in proinflammatory cytokines, and modulation of junctional complexes in the epithelial barrier. Indeed, using QS molecules could play a role in both components (gut microbiota and host responses) of gut ecosystem disorders observed in metabolic and inflammatory diseases. AHL-based QS devices already exist as therapeutic applications for the dynamic control of Gram-negative bacterial populations, especially in infectious diseases. Other QS molecules could be extended as potential clinical therapies for diseases related to the gut microbiota and involve biofilm formation and antibiotic resistance [154]. Research efforts must investigate the potential of this new trial.

In addition to therapeutic applications, one could consider QS molecules as reliable biomarkers for dysbiosis-related chronic diseases such as IBD or CRC. Indeed, it has been shown that the presence of some AI-1 QS molecules in the gut ecosystem directly correlates with bacterial group size [39]. AHLs could represent a biomarker of the bacterial level population acting as a magnifying glass for dysbiosis. In addition, AI-2 concentration increased during adenomas to colorectal transition and CRC progression[41]. This opens the perspective for using the QS system as a biomarker for the prevention and follow-up of chronic diseases.

III.2 For the future

Knowing which commensal bacteria carry QS systems, their site of production, their ability to be mobilized during dysbiosis, and their effect on the luminal or mucosal microenvironment are as many unresolved questions. The scientific community, together with gastroenterologists, needs to tackle these issues to pave the way for translation into clinical use. Future directions also involve designing dedicated QS derivatives targeting either the host cells or the bacterial compartment. Such QS derivatives have already been reported to control the epithelial cell inflammation

pathway with a wider effect than natural 3-oxoC12:2 without bacterial-activating properties^[92]. Using QS molecules as an approach to tackle the gut microbiota compartment has already been proven to be a successful strategy ^[42], thus leading to interesting perspectives. Considering the QS system as a new player in the gut ecosystem, it represents a control platform to shape the host's gut microbiota population and/or major physiological pathways.

In conclusion, the intestinal microbiota interacts mutually with epithelial and immune cells of the coevolved host in a beneficial, reciprocal relationship. The QS signaling of bacteria probably contributes substantially to establishing symbiotic interactions in certain dynamics of interaction between the different kingdoms. A better understanding of QS systems by researchers and gastroenterologists involved in describing and managing ecological disorders of the intestinal ecosystem is a new approach that opens up fascinating therapeutic opportunities.

ABBREVIATIONS

AHL: Acyl Homoserine Lactone; AhR: Aryl Hydrocarbon Receptor; AI: AutoInducer; AIEC: adherent-invasive *Escherichia coli*; AIP: AutoInducer Peptides; B cells: lymphocytes B; CAI: *Cholera* AutoInducer-1; CDI: *Clostridioides difficile* infection; CRC: ColoRectal Cancer; CSF: Competence and Sporulation Factor; DSS: Dextran Sulfate Sodium; EHEC: enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EPEC: enteropathogenic *Escherichia coli*; HHQ: 4-hydroxy-2-heptylquinoline; HSL: Homoserine lactones; HSP27: Heat Shock Protein 27; IBD: Inflammatory Bowel Diseases; IFN γ : Interferon- γ ; IL: InterLeukin; ILC: Innate Lymphoid Cells; IQGAP1: IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1; IQS: Integrated *Quorum Sensing*; LPS: lipopolysaccharides; MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase; MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase; MMP-2/-3: Matrix Metalloproteinase-2/-3; NF- κ B: Nuclear Factor-Kappa B; OCTN2 (organic cation/carnitine transporter 2); PAR: Protease-Activated Receptor; PON: Paraoxonase; PPAR γ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ ; PQS: *Pseudomonas* Quinolone Signal; QS: Quorum Sensing R-THMF: (2R,4S)-2-methyl-2,3,3',4-tetrahydroxytetrahydrofuran); Rac1/Cdc42: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1/ Cell division control protein 42 homolog; SCFA: short chain fatty acids; S-THMF-borate: (2S,4S)-2-methyl-2,3,3',4-tetrahydroxy-tetrahydrofuran-borate; T cells: Lymphocytes T; TAS2R38: Taste Receptor Type 2 member 38 Th: T helper; TJ: Tight Junctions; TLR: Toll Like Receptors; TNFSF9: TNF Superfamily Member 9; TNF α : Tumor Necrosis Factor- α ; Treg: regulatory T cells

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dominique Rainteau for his support and knowledge on Quorum Sensing.

CONFLICT-OF-INTERESTS

P.S. reports consulting fees from Abbvie, Takeda, Merck-MSD, Pfizer, Astellas, Janssen and Biocodex and grants from Biocodex and Janssen. These COIs are unrelated to the current presentation.

REFERENCES

- 1 **Le Chatelier E**, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto J-M, Kennedy S. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; **500**: 541-546 [PMID: 23985870 DOI: 10.1038/nature12506]
- 2 **Sokol H**, Seksik P. The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; **26**: 327-331 [PMID: 20445446 DOI: 10.1097/MOG.0b013e328339536b]
- 3 **Agus A**, Clément K, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut* 2021; **70**:1174-1182 [PMID: 20445446 DOI: 10.1097/MOG.0b013e328339536b]
- 4 **Qin J**, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Meta HITC, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; **464**: 59-65 [PMID: 20203603 DOI: 10.1038/nature08821]
- 5 **Jandhyala SM**, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015; **21**: 8787-803 [PMID: 26269668 DOI: 10.3748/wjg.v21.i29.8787]
- 6 **Coquant G**, Grill JP, Seksik P. Impact of N-Acyl-Homoserine Lactones, Quorum Sensing Molecules, on Gut Immunity. *Front Immunol* 2020; **11**: 1827 [PMID: 32983093 DOI: 10.3389/fimmu.2020.01827]
- 7 **Prescott RD**, Decho AW. Flexibility and adaptability of quorum sensing in nature. *Trends Microbiol* 2020; **28**: 436-444 [PMID: 32001099 DOI: 10.1016/j.tim.2019.12.004]

- 8 **Wu L**, Luo Y. Bacterial Quorum-Sensing Systems and Their Role in Intestinal Bacteria-Host Crosstalk. *Front Microbiol* 2021; **12**: 611413 [PMID: 33584614 DOI: 10.3389/fmicb.2021.611413]
- 9 **Nealson KH**, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 1979; **43**: 496-518 [PMID: 396467 DOI: 10.1128/mr.43.4.496-518.1979]
- 10 **Fuqua WC**, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; **176**: 269-275 [PMID: 8288518 DOI: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994]
- 11 **Parsek MR**, Greenberg E. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 2005; **13**: 27-33 [PMID: 15639629 DOI: 10.1016/j.tim.2004.11.007]
- 12 **Ng W-L**, Bassler BL. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu Rev Genet* 2009; **43**: 197-222 [PMID: 19686078 DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134304]
- 13 **Takano E**, Chakraborty R, Nihira T, Yamada Y, Bibb MJ. A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 2001; **41**: 1015-1028 [PMID: 11555283 DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02562.x]
- 14 **Du Y-L**, Shen X-L, Yu P, Bai L-Q, Li Y-Q. Gamma-butyrolactone regulatory system of *Streptomyces chattanoogensis* links nutrient utilization, metabolism, and development. *Appl Environ Microbiol* 2011; **77**: 8415-8426 [PMID: 21948843 DOI: 10.1128/AEM.05898-11]
- 15 **Galloway WR**, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev* 2011; **111**: 28-67 [PMID: 21182299 DOI: 10.1021/cr100109t]
- 16 **Engbrecht J**, Silverman M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 4154-4158 [PMID: 6377310 DOI: 10.1073/pnas.81.13.4154]

- 17 **Stevens AM**, Dolan KM, Greenberg EP. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 12619-12623 [PMID: 7809088 DOI: 10.1073/pnas.91.26.12619]
- 18 **Case RJ**, Labbate M, Kjelleberg S. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* 2008; **2**: 345-349 [PMID: 18273067 DOI: 10.1038/ismej.2008.13]
- 19 **Sperandio V**, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 8951-8956 [PMID: 12847292 DOI: 10.1073/pnas.1537100100]
- 20 **Carlson-Banning KM**, Sperandio V. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outwits hosts through sensing small molecules. *Curr Opin Microbiol* 2018; **41**: 83-88 [PMID: 29258058 DOI: 10.1016/j.mib.2017.12.002]
- 21 **Walters M**, Sircili MP, Sperandio V. AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2006; **188**: 5668-5681 [PMID: 16885435 DOI: 10.1128/JB.00648-06]
- 22 **Kim CS**, Gatsios A, Cuesta S, Lam YC, Wei Z, Chen H, Russell RM, Shine EE, Wang R, Wyche TP, Piizzi G, Flavell RA, Palm NW, Sperandio V, Crawford JM. Characterization of Autoinducer-3 Structure and Biosynthesis in *E. coli*. *ACS Cent Sci* 2020; **6**: 197-206 [PMID: 32123737 DOI: 10.1021/acscentsci.9b01076]
- 23 **Schauder S**, Bassler BL. The languages of bacteria. *Genes Dev* 2001; **15**: 1468-1480 [PMID: 11410527 DOI: 10.1101/gad.899601]
- 24 **Surette MG**, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1639-1644 [PMID: 9990077 DOI: 10.1073/pnas.96.4.1639 DOI: 10.1073/pnas.96.4.1639]
- 25 **Chen X**, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 2002; **415**: 545-549 [PMID: 11823863 DOI: 10.1038/415545a]
- 26 **Miller ST**, Xavier KB, Campagna SR, Taga ME, Semmelhack MF, Bassler BL, Hughson FM. *Salmonella typhimurium* Recognizes a Chemically Distinct Form of the

Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2. *Mol Cell* 2004; **15**: 677-687 [PMID: 15350213 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.020>]

27 **Pereira CS**, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2013; **37**: 156-181 [PMID: 22712853 DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00345.x]

28 **Defoirdt T**. Amino acid-derived quorum sensing molecules controlling the virulence of vibrios (and beyond). *PLoS Pathog* 2019; **15**: e1007815-e1007815 [PMID: 31295324 DOI: 10.1371/journal.ppat.1007815]

29 **Lee J-H**, Lee J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 2010; **34**: 426-444 [PMID: 20070374 DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x]

30 **Pena RT**, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, Bleriot I, Bou G, García-Contreras R, Wood TK, Tomás M. Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front Microbiol* 2019; **10**: 1100 [PMID: 31231316 PMCID: PMC6567927 DOI: 10.3389/fmicb.2019.01100]

31 **Rumbaugh KP**, Kaufmann GF. Exploitation of host signaling pathways by microbial quorum sensing signals. *Curr Opin Microbiol* 2012; **15**: 162-168 [PMID: 22204809 DOI: 10.1016/j.mib.2011.12.003]

32 **Wang G**, Huang S, Wang Y, Cai S, Yu H, Liu H, Zeng X, Zhang G, Qiao S. Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2019; **76**: 3917-3937 [PMID: 31250035 DOI: 10.1007/s00018-019-03190-6]

33 **Defoirdt T**. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends Microbiol* 2018; **26**: 313-328 [PMID: 29132819 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>]

34 **Tobias NJ**, Brehm J, Kresovic D, Brameyer S, Bode HB, Heermann R. New vocabulary for bacterial communication. *ChemBioChem* 2020; **21**: 759-68 [PMID: 31709676 DOI: 10.1002/cbic.201900580]

35 **Agodi A**, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Intensive Care Med* 2007; **33**: 1155-1161 [PMID: 17503016 DOI: 10.1007/s00134-007-0671-6]

- 36 **Bertrand X**, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, Helias JP. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med* 2001; **27**: 1263-1268 [PMID: 11511937 DOI: 10.1007/s001340100979]
- 37 **Swearingen MC**, Sabag-Daigle A, Ahmer BMM. Are There Acyl-Homoserine Lactones within Mammalian Intestines? *J Bacteriol* 2013; **195**: 173-179 [PMID: 23144246 DOI: 10.1128/jb.01341-12]
- 38 **Kumari A**, Pasini P, Deo SK, Flomenhoft D, Shashidhar H, Daunert S. Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules. *Anal Chem* 2006; **78**: 7603-7609 [PMID: 17105149 DOI: 10.1021/ac061421n]
- 39 **Landman C**, Grill J-P, Mallet J-M, Marteau P, Humbert L, Le Balc'h E, Maubert M-A, Perez K, Chaara W, Brot L, Beaugerie L, Sokol H, Thenet S, Rainteau D, Seksik P, Quévrain E. 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 [PMID: 30157234 DOI: 10.1371/journal.pone.0202587]
- 40 **Kaper JB**, Sperandio V. Bacterial Cell-to-Cell Signaling in the Gastrointestinal Tract. *Infect Immun* 2005; **73**: 3197-3209 [PMID: 15908344 DOI: 10.1128/iai.73.6.3197-3209.2005]
- 41 **Li Q**, Peng W, Wu J, Wang X, Ren Y, Li H, Peng Y, Tang X, Fu X. Autoinducer-2 of gut microbiota, a potential novel marker for human colorectal cancer, is associated with the activation of TNFSF9 signaling in macrophages. *Oncoimmunology* 2019; **8**: e1626192 [PMID: 31646072 DOI: 10.1080/2162402x.2019.1626192]
- 42 **Thompson JA**, Oliveira RA, Djukovic A, Ubeda C, Xavier KB. Manipulation of the Quorum Sensing Signal AI-2 Affects the Antibiotic-Treated Gut Microbiota. *Cell Reports* 2015; **10**: 1861-1871 [PMID: 25801025 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.049>]
- 43 **Darkoh C**, Plants-Paris K, Bishoff D, DuPont HL. *Clostridium difficile* modulates the gut microbiota by inducing the production of indole, an interkingdom signaling and antimicrobial molecule. *mSystems* 2019; **4**: e00346-18 [PMID: 30944877 PMID: PMC6426650 DOI: 10.1128/mSystems.00346-18]

- 44 **Chen J**, Ma M, Uzal FA, McClane BA. Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut microbes* 2014; **5**: 96-107 [PMID: 24061146 PMCID: PMC4049945 DOI: 10.4161/gmic.26419]
- 45 **Ismail AS**, Valastyan JS, Bassler BL. A Host-Produced Autoinducer-2 Mimic Activates Bacterial Quorum Sensing. *Cell Host Microbe* 2016; **19**: 470-480 [PMID: 26996306 DOI: 10.1016/j.chom.2016.02.020]
- 46 **Pinheiro J**, Lisboa J, Pombinho R, Carvalho F, Carreaux A, Brito C, Pöntinen A, Korkeala H, dos Santos NM S, Morais-Cabral JH, Sousa S, Cabanes D. MouR controls the expression of the *Listeria monocytogenes* Agr system and mediates virulence. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**: 9338-9352 [PMID: 30011022 DOI: 10.1093/nar/gky624]
- 47 **Turner JR**. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 799-809 [PMID: 19855405 DOI: 10.1038/nri2653]
- 48 **Bevins CL**, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2011; **9**: 356-368 [PMID: 21423246 DOI: 10.1038/nrmicro2546]
- 49 **Johansson ME**, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol* 2016; **16**: 639-649 [PMID: 27498766 DOI: 10.1038/nri.2016.88]
- 50 **Hooper LV**, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 159-169 [PMID: 20182457 DOI: 10.1038/nri2710]
- 51 **Peterson LW**, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; **14**: 141-153 [PMID: 24566914 DOI: 10.1038/nri3608]
- 52 **Wang L**, Zhu L, Qin S. Gut Microbiota Modulation on Intestinal Mucosal Adaptive Immunity. *J Immunol Res* 2019; **2019**: 4735040-4735040 [PMID: 31687412 DOI: 10.1155/2019/4735040]
- 53 **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 [PMID: 30428481 DOI: 10.1159/000494069]

- 54 **Golovkine G**, Reboud E, Huber P. Pseudomonas aeruginosa Takes a Multi-Target Approach to Achieve Junction Breach. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; **7**: 532 [PMID: 29379773 DOI: 10.3389/fcimb.2017.00532]
- 55 **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 [PMID: 24742991 DOI: 10.1152/ajpgi.00016.2014]
- 56 **Halldorsson S**, Gudjonsson T, Gottfredsson M, Singh PK, Gudmundsson GH, Baldursson O. Azithromycin maintains airway epithelial integrity during Pseudomonas aeruginosa infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; **42**: 62-68 [PMID: 19372247 DOI: 10.1165/rcmb.2008-0357OC]
- 57 **Schwarzer C**, Ravishankar B, Patanwala M, Shuai S, Fu Z, Illek B, Fischer H, Machen TE. Thapsigargin blocks Pseudomonas aeruginosa homoserine lactone-induced apoptosis in airway epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; **306**: C844-C855 [PMID: 24598360 DOI: 10.1152/ajpcell.00002.2014]
- 58 **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. *Eur J Cell Biol* 2010; **89**: 584-597 [PMID: 20434232 DOI: 10.1016/j.ejcb.2010.03.002]
- 59 **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**: 313-326 [PMID: 19038248 DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.10.044]
- 60 **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**: 6921-6928 [PMID: 17157842 DOI: 10.1016/j.febslet.2006.11.057]
- 61 **Aguanno D**, Coquant G, Postal BG, Osinski C, Wieckowski M, Stockholm D, Grill JP, Carriere V, Seksik P, Thenet S. The intestinal quorum sensing 3-oxo-C12:2 Acyl homoserine lactone limits cytokine-induced tight junction disruption. *Tissue Barriers* 2020; **8**: 1832877 [PMID: 33100129 DOI: 10.1080/21688370.2020.1832877]

- 62 **Tao S**, Xiong Y, Han D, Pi Y, Zhang H, Wang J. N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone disrupts intestinal epithelial barrier through triggering apoptosis and collapsing extracellular matrix and tight junction. *J Cell Physiol* 2021; **236**: 5771-5784 [PMID: 33400297 DOI: 10.1002/jcp.30261]
- 63 **Buckley A**, Turner JR. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; **10**: a029314 [PMID: 28507021 DOI: 10.1101/cshperspect.a029314]
- 64 **Su L**, Nalle SC, Shen L, Turner ES, Singh G, Breskin LA, Khramtsova EA, Khramtsova G, Tsai PY, Fu YX, Abraham C, Turner JR. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology* 2013; **145**: 407-415 [PMID: 23619146 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.04.011]
- 65 **Thoo L**, Noti M, Krebs P. Keep calm: the intestinal barrier at the interface of peace and war. *Cell Death Dis* 2019; **10**: 1-13 [PMID: 31699962 DOI: 10.1038/s41419-019-2086-z]
- 66 **France MM**, Turner JR. The mucosal barrier at a glance. *J Cell Sci* 2017; **130**: 307-314 [PMID: 28062847 DOI: 10.1242/jcs.193482]
- 67 **Tao S**, Luo Y, Bin H, Liu J, Qian X, Ni Y, Zhao R. 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**:2045-2322 [PMID: 27364593 DOI: 10.1038/srep28778]
- 68 **Tao S**, Niu L, Cai L, Geng Y, Hua C, Ni Y, Zhao R. N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone modulates mitochondrial function and suppresses proliferation in intestinal goblet cells. *Life Sci* 2018; **201**: 81-88 [PMID: 29596921 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.049>]
- 69 **Tao S**, Sun Q, Cai L, Geng Y, Hua C, Ni Y, Zhao R. Caspase-1-dependent mechanism mediating the harmful impacts of the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone on the intestinal cells. *J Cell Physiol* 2019; **234**: 3621-3633 [PMID: 30471106 DOI: 10.1002/jcp.27132]
- 70 **Taguchi R**, Tanaka S, Joe G-H, Maseda H, Nomura N, Ohnishi J, Ishizuka S, Shimizu H, Miyazaki H. 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-C168 [PMID: 24848113 DOI: 10.1152/ajpcell.00271.2013]

71 **Sturm A**, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 348-353 [PMID: 18200658 DOI: 10.3748/wjg.14.348]

72 **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; **8**: e1002953 [PMID: 23071436 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002953]

73 **Charlton TS**, De Nys R, Netting A, Kumar N, Hentzer M, Givskov M, Kjelleberg S. 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. *Environ Microbiol* 2000; **2**: 530-541 [PMID: 11233161 DOI: 10.1046/j.1462-2920.2000.00136.x]

74 **Fujiya M**, Musch MW, Nakagawa Y, Hu S, Alverdy J, Kohgo Y, Schneewind O, Jabri B, Chang EB. The *Bacillus subtilis* Quorum-Sensing Molecule CSF Contributes to Intestinal Homeostasis via OCTN2, a Host Cell Membrane Transporter. *Cell Host Microbe* 2007; **1**: 299-308 [PMID: 18005709 DOI: 10.1016/j.chom.2007.05.004]

75 **Petrof EO**, Ciancio MJ, Chang EB. Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chin Dig Dis* 2004; **5**: 45-50 [PMID: 15612656 DOI: 10.1111/j.1443-9573.2004.00154.x]

76 **Bansal T**, Alaniz RC, Wood TK, Jayaraman A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 228-233 [PMID: 19966295 DOI: 10.1073/pnas.0906112107]

77 **Shimada Y**, Kinoshita M, Harada K, Mizutani M, Masahata K, Kayama H, Takeda K. Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. *PloS One* 2013; **8**: e80604 [PMID: 24278294 DOI: 10.1371/journal.pone.0080604]

78 **Shin J-H**, Lee Y-K, Shon W-J, Kim B, Jeon CO, Cho J-Y, Morse HC, Choi EY, Shin D-M. Gut microorganisms and their metabolites modulate the severity of acute colitis in a tryptophan metabolism-dependent manner. *Eur J Nutr* 2020; **59**:3591-3601 [PMID: 32055962 DOI: 10.1007/s00394-020-02194-4]

79 **Venkatesh M**, Mukherjee S, Wang H, Li H, Sun K, Benechet AP, Qiu Z, Maher L, Redinbo MR, Phillips RS, Fleet JC, Kortagere S, Mukherjee P, Fasano A, Le Ven J, Nicholson JK, Dumas ME, Khanna KM, Mani S. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity* 2014; **41**: 296-310 [PMID: 25065623 DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.014]

80 **Vyhlídalová B**, Krasulová K, Pečinková P, Marcalíková A, Vrzal R, Zemánková L, Vančo J, Trávníček Z, Vondráček J, Karasová M. Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: a detailed characterization. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 2614 [PMID: 32283770 DOI: 10.3390/ijms21072614]

81 **Lamas B**, Richard ML, Leducq V, Pham HP, Michel ML, Da Costa G, Bridonneau C, Jegou S, Hoffmann TW, Natividad JM, Brot L, Taleb S, Couturier-Maillard A, Nion-Larmurier I, Merabtene F, Seksik P, Bourrier A, Cosnes J, Ryffel B, Beaugerie L, Launay JM, Langella P, Xavier RJ, Sokol H. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* 2016; **22**: 598-605 [PMID: 27158904 DOI: 10.1038/nm.4102]

82 **Natividad JM**, Agus A, Planchais J, Lamas B, Jarry AC, Martin R, Michel ML, Chong-Nguyen C, Roussel R, Straube M, Jegou S, McQuitty C, Le Gall M, da Costa G, Lecornet E, Michaudel C, Modoux M, Glodt J, Bridonneau C, Sovran B, Dupraz L, Bado A, Richard ML, Langella P, Hansel B, Launay JM, Xavier RJ, Duboc H, Sokol H. Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab* 2018; **28**: 737-749 e734 [PMID: 30057068 DOI: 10.1016/j.cmet.2018.07.001]

83 **Zelante T**, Iannitti Rossana G, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P, Romani L. Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and

Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Immunity* 2013; **39**: 372-385 [PMID: 23973224 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.003>]

84 **Han B**, Sheng B, Zhang Z, Pu A, Yin J, Wang Q, Yang K, Sun L, Yu M, Qiu Y, Xiao W, Yang H. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Intestinal Obstruction Ameliorates Intestinal Barrier Dysfunction Via Suppression of MLCK-MLC Phosphorylation Pathway. *Shock* 2016; **46**: 319-328 [PMID: 00024382-201609000-00014 DOI: 10.1097/SHK.0000000000000594]

85 **Postal BG**, Ghezzal S, Aguanno 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. *Mol Metab* 2020; **39**: 101007 [PMID: 32360426 DOI: 10.1016/j.molmet.2020.101007]

86 **Yu M**, Wang Q, Ma Y, Li L, Yu K, Zhang Z, Chen G, Li X, Xiao W, Xu P, Yang H. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Modulates Intestinal Epithelial Barrier Function by Maintaining Tight Junction Integrity. *Int J Biol Sci* 2018; **14**: 69-77 [PMID: 29483826 DOI: 10.7150/ijbs.22259]

87 **Ziegler N**, Awwad K, Fisslthaler B, Reis M, Devraj K, Corada M, Minardi SP, Dejana E, Plate KH, Fleming I, Liebner S. beta-Catenin Is Required for Endothelial Cyp1b1 Regulation Influencing Metabolic Barrier Function. *J Neurosci* 2016; **36**: 8921-8935 [PMID: 27559173 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0148-16.2016]

88 **Taleb S**. Tryptophan dietary impacts gut barrier and metabolic diseases. *Front Immunol* 2019; **10**: 2113 [PMID: 31552046 DOI: 10.3389/fimmu.2019.02113]

89 **Wang J**, Wang P, Tian H, Tian F, Zhang Y, Zhang L, Gao X, Wang X. Aryl hydrocarbon receptor/IL-22/Stat3 signaling pathway is involved in the modulation of intestinal mucosa antimicrobial molecules by commensal microbiota in mice. *Innate Immun* 2018; **24**: 297-306 [PMID: 29976114 DOI: 10.1177/1753425918785016]

90 **Cotton JA**, Platnich JM, Muruve DA, Jijon HB, Buret AG, Beck PL. Interleukin-8 in gastrointestinal inflammation and malignancy: induction and clinical consequences. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* 2016; **8**: 13-34 [DOI: 10.2147/IJICMR.S63682]

91 **Ghezzal S**, Postal BG, Quevrain E, Brot L, Seksik P, Leturque A, Thenet S, Carriere V. Palmitic acid damages gut epithelium integrity and initiates inflammatory

cytokine production. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2020; **1865**: 158530 [PMID: 31647994 DOI: 10.1016/j.bbalip.2019.158530]

92 **Peyrottes A**, Coquant G, Brot L, Rainteau D, Seksik P, Grill JP, Mallet JM. Anti-Inflammatory Effects of Analogues of N-Acyl Homoserine Lactones on Eukaryotic Cells. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 9448 [PMID: 33322538 DOI: 10.3390/ijms21249448]

93 **Turkina MV**, Vikström E. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Innate Immun* 2019; **11**: 263-279 [PMID: 30428481 DOI: 10.1159/000494069]

94 **Telford G**, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT, Appleby P, Sewell H, Stewart GS, Bycroft BW, Pritchard DI. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 1998; **66**: 36-42 [PMID: 9423836 DOI: 10.1128/IAI.66.1.36-42.1998]

95 **Smith RS**, Harris SG, Phipps RP, Iglewski BH. The *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol* 2002; **184**: 1132-9 [PMID: 11807074 DOI: 10.1128/jb.184.4.1132-1139.2002]

96 **Ritchie AJ**, Jansson A, Stallberg J, Nilsson P, Lysaght P, Cooley MA. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect Immun* 2005; **73**: 1648-1655 [PMID: 15731065 DOI: 10.1128/iai.73.3.1648-1655.2005]

97 **Kim K**, Kim SH, Lépine F, Cho YH, Lee GR. Global gene expression analysis on the target genes of PQS and HHQ in J774A.1 monocyte/macrophage cells. *Microb Pathog* 2010; **49**: 174-180 [PMID: 20595074 DOI: 10.1016/j.micpath.2010.05.009]

98 **Lin J**, Cheng J, Wang Y, Shen X. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; **8**: 230-230 [PMID: 30023354 DOI: 10.3389/fcimb.2018.00230]

99 **Li Y**, Zhou H, Zhang Y, Chen C, Huang B, Qu P, Zeng J, Shunmei E, Zhang X, Liu J. N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone promotes the induction of

regulatory T-cells by preventing human dendritic cell maturation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015; **240**: 896-903 [PMID: 25749498 DOI: 10.1177/1535370214564742]

100 **Skindersoe ME**, Zeuthen LH, Brix S, Fink LN, Lazenby J, Whittall C, Williams P, Diggle SP, Froekiaer H, Cooley M, Givskov M. Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; **55**: 335-345 [PMID: 19187218 DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00533.x]

101 **Jacobi CA**, Schiffner F, Henkel M, Waibel M, Stork B, Daubrawa M, Eberl L, Gregor M, Wesselborg S. Effects of bacterial N-acyl homoserine lactones on human Jurkat T lymphocytes-OdDHL induces apoptosis via the mitochondrial pathway. *Int J Medl Microbiol* 2009; **299**: 509-519 [PMID: 19464950 DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.03.005]

102 **Tateda K**, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, Standiford TJ, Ishiguro M, Yamaguchi K. The Pseudomonas aeruginosa autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 2003; **71**: 5785-5793 [PMID: 14500500 DOI: 10.1128/iai.71.10.5785-5793.2003]

103 **Kim K**, Kim YU, Koh BH, Hwang SS, Kim SH, Lépine F, Cho YH, Lee GR. HHQ and PQS, two Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor-kappaB pathway. *Immunology* 2010; **129**: 578-588 [PMID: 20102415 DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03160.x]

104 **Kravchenko VV**, Kaufmann GF, Mathison JC, Scott DA, Katz AZ, Grauer DC, Lehmann M, Meijler MM, Janda KD, Ulevitch RJ. Modulation of Gene Expression via Disruption of NF- κ B Signaling by a Bacterial Small Molecule. *Science* 2008; **321**: 259-263 [PMID: 18566250 DOI: 10.1126/science.1156499]

105 **Kravchenko VV**, Kaufmann GF, Mathison JC, Scott DA, Katz AZ, Wood MR, Brogan AP, Lehmann M, Mee JM, Iwata K, Pan Q, Fearn C, Knaus UG, Meijler MM, Janda KD, Ulevitch RJ. N-(3-oxo-acyl)homoserine lactones signal cell activation through a mechanism distinct from the canonical pathogen-associated molecular pattern recognition receptor pathways. *J Biol Chem* 2006; **281**: 28822-28830 [PMID: 16893899 DOI: 10.1074/jbc.M606613200]

- 106 **Wu R**, Li X, Ma N, Jin X, Yuan X, Qu C, Tang H, Liu Z, Zhang Z. Bacterial Quorum Sensing Molecules Promote Allergic Airway Inflammation by Activating the Retinoic Acid Response. *iScience* 2020; **23**: 101288 [PMID: 32622265 DOI: 10.1016/j.isci.2020.101288]
- 107 **Vikström E**, Magnusson KE, Pivoriūnas A. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone stimulates phagocytic activity in human macrophages through the p38 MAPK pathway. *Microbes Infect* 2005; **7**: 1512-1518 [PMID: 16039899 DOI: 10.1016/j.micinf.2005.05.012]
- 108 **Gaida MM**, Dapunt U, Hänsch GM. Sensing developing biofilms: the bitter receptor T2R38 on myeloid cells. *Pathog Dis* 2016; **74**: ftw004 [PMID: 26782143 DOI: 10.1093/femspd/ftw004]
- 109 **Lee RJ**, Xiong G, Kofonow JM, Chen B, Lysenko A, Jiang P, Abraham V, Doghramji L, Adappa ND, Palmer JN. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J Clin Invest* 2012; **122**: 4145-4159 [PMID: 23041624 DOI: 10.1172/JCI64240]
- 110 **Tizzano M**, Gulbransen BD, Vandenbeuch A, Clapp TR, Herman JP, Sibhatu HM, Churchill ME, Silver WL, Kinnamon SC, Finger TE. Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 3210-3215 [PMID: 20133764 DOI: 10.1073/pnas.0911934107]
- 111 **Rozengurt E**. Taste receptors in the gastrointestinal tract. I. Bitter taste receptors and α -gustducin in the mammalian gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; **291**: G171-G177 [PMID: 16710053 DOI: 10.1152/ajpgi.00073.2006]
- 112 **Carrai M**, Steinke V, Vodicka P, Pardini B, Rahner N, Holinski-Feder E, Morak M, Schackert HK, Görgens H, Stemmler S. Association between TAS2R38 gene polymorphisms and colorectal cancer risk: a case-control study in two independent populations of Caucasian origin. *PLoS One* 2011; **6**: e20464 [PMID: 21674048 DOI: 10.1371/journal.pone.0020464]
- 113 **Cohen LJ**, Esterhazy D, Kim S-H, Lemetre C, Aguilar RR, Gordon EA, Pickard AJ, Cross JR, Emiliano AB, Han SM. Commensal bacteria make GPCR ligands that mimic human signalling molecules. *Nature* 2017; **549**: 48-53 [PMID: 28854168 DOI: 10.1038/nature23874]

- 114 **Cooley M**, Chhabra SR, Williams P. N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing: A Twist in the Tail and a Blow for Host Immunity. *Chem Biol* 2008; **15**: 1141-1147 [PMID: 19022174 DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.10.010]
- 115 **Jahoor A**, Patel R, Bryan A, Do C, Krier J, Watters C, Wahli W, Li G, Williams SC, Rumbaugh KP. Peroxisome proliferator-activated receptors mediate host cell proinflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *J Bacteriol* 2008; **190**: 4408-4415 [PMID: 18178738 DOI: 10.1128/JB.01444-07]
- 116 **Moura-Alves P**, Puyskens A, Stinn A, Klemm M, Guhlich-Bornhof U, Dorhoi A, Furkert J, Kreuchwig A, Protze J, Lozza L, Pei G, Saikali P, Perdomo C, Mollenkopf HJ, Hurwitz R, Kirschhoefer F, Brenner-Weiss G, Weiner J, 3rd, Oschkinat H, Kolbe M, Krause G, Kaufmann SHE. Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Science* 2019; **366**: eaaw1629 [PMID: 31857448 DOI: 10.1126/science.aaw1629]
- 117 **Lamas B**, Natividad JM, Sokol H. Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunol* 2018; **11**: 1024-1038 [PMID: 29626198 DOI: 10.1038/s41385-018-0019-2]
- 118 **Trikha P**, Lee DA. The role of AhR in transcriptional regulation of immune cell development and function. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2020; **1873**: 188335 [PMID: 31816350 DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.188335]
- 119 **Li H**, Li X, Song C, Zhang Y, Wang Z, Liu Z, Wei H, Yu J. Autoinducer-2 Facilitates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Pathogenicity in Vitro and in Vivo. *Front Microbiol* 2017; **8**: 1944 [PMID: 29089927 DOI: 10.3389/fmicb.2017.01944]
- 120 **Walters M**, Sperandio V. Autoinducer 3 and Epinephrine Signaling in the Kinetics of Locus of Enterocyte Effacement Gene Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2006; **74**: 5445-5455 [PMID: 16988219 DOI: 10.1128/IAI.00099-06]
- 121 **De Spiegeleer A**, Elewaut D, Van Den Noortgate N, Janssens Y, Debunne N, Van Langenhove S, Govindarajan S, De Spiegeleer B, Wynendaele E. Quorum sensing molecules as a novel microbial factor impacting muscle cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; **1866**: 165646 [PMID: 31870715 DOI: 10.1016/j.bbadis.2019.165646]

- 122 **Wynendaele E**, Verbeke F, Stalmans S, Gevaert B, Janssens Y, Van De Wiele C, Peremans K, Burvenich C, De Spiegeleer B. Quorum sensing peptides selectively penetrate the blood-brain barrier. *PLoS One* 2015; **10**: e0142071 [PMID: 26536593 DOI: 10.1371/journal.pone.0142071]
- 123 **Gao J**, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, Li T, Yin Y. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; **8**: 13 [PMID: 29468141 DOI: 10.3389/fcimb.2018.00013]
- 124 **Roager HM**, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun* 2018; **9**: 3294 [PMID: 30120222 DOI: 10.1038/s41467-018-05470-4]
- 125 **Alexeev EE**, Lanis JM, Kao DJ, Campbell EL, Kelly CJ, Battista KD, Gerich ME, Jenkins BR, Walk ST, Kominsky DJ, Colgan SP. Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *Am J Pathol* 2018; **188**: 1183-1194 [PMID: 29454749 DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.01.011]
- 126 **Dong F**, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor as a mediator of host-microbiota interplay. *Gut Microbes* 2020; **12**: 1859812 [PMID: 33382356 DOI: 10.1080/19490976.2020.1859812]
- 127 **Lamas B**, Hernandez-Galan L, Galipeau HJ, Constante M, Clarizio A, Jury J, Breyner NM, Caminero A, Rueda G, Hayes CL, McCarville JL, Bermudez Brito M, Planchais J, Rolhion N, Murray JA, Langella P, Loonen LMP, Wells JM, Bercik P, Sokol H, Verdu EF. Aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is decreased in celiac disease leading to intestinal inflammation. *Sci Transl Med* 2020; **12**: eaba0624 [PMID: 33087499 DOI: 10.1126/scitranslmed.aba0624]
- 128 **Sears CL**, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe* 2014; **15**: 317-328 [PMID: 24629338 DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.007]
- 129 **Greten FR**, Grivennikov SI. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity* 2019; **51**: 27-41 [PMID: 31315034 DOI: 10.1016/j.immuni.2019.06.025]
- 130 **Schwabe RF**, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 800-812 [PMID: 24132111 DOI: 10.1038/nrc3610]

- 131 **Tjalsma H**, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 2012; **10**: 575-582 [PMID: 22728587 DOI: 10.1038/nrmicro2819]
- 132 **Wu S**, Rhee K-J, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen H-R, Huso DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 2009; **15**: 1016-1022 [PMID: 19701202 DOI: 10.1038/nm.2015]
- 133 **Castellarin M**, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; **22**: 299-306 [PMID: 22009989 DOI: 10.1101/gr.126516.111]
- 134 **Dejea CM**, Wick EC, Hechenbleikner EM, White JR, Welch JLM, Rossetti BJ, Peterson SN, Snedrud EC, Borisy GG, Lazarev M. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**: 18321-18326 [PMID: 25489084 DOI: 10.1073/pnas.1406199111]
- 135 **Kostic AD**, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Taberero J. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; **22**: 292-298 [PMID: 22009990 DOI: 10.1101/gr.126573.111]
- 136 **Li S**, Konstantinov SR, Smits R, Peppelenbosch MP. Bacterial biofilms in colorectal cancer initiation and progression. *Trends Mol Med* 2017; **23**: 18-30 [PMID: 27986421 DOI: 10.1016/j.molmed.2016.11.004]
- 137 **Wu J**, Li K, Peng W, Li H, Li Q, Wang X, Peng Y, Tang X, Fu X. Autoinducer-2 of *Fusobacterium nucleatum* promotes macrophage M1 polarization via TNFSF9/IL-1 β signaling. *Int Immunopharmacol* 2019; **74**: 105724 [PMID: 31272064 DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105724]
- 138 **Bearson BL**, Bearson SMD. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* 2008; **44**: 271-278 [PMID: 17997077 DOI: 10.1016/j.micpath.2007.10.001]

- 139 **Luqman A**, Kharisma VD, Ruiz RA, Götz F. In Silico and in Vitro Study of Trace Amines (TA) and Dopamine (DOP) Interaction with Human Alpha 1-Adrenergic Receptor and the Bacterial Adrenergic Receptor QseC. *Cell Physiol Biochem* 2020; **54**: 888-898 [PMID: 32930525 DOI: 10.33594/000000276]
- 140 **Lyte M**. The role of microbial endocrinology in infectious disease. *J Endocrinol* 1993; **137**: 343-345 [PMID: 8371072 DOI: 10.1677/joe.0.1370343]
- 141 **Grandclément C**, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* 2016; **40**: 86-116 [PMID: 26432822 DOI: 10.1093/femsre/fuv038]
- 142 **Teiber JF**, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer GL, Haley RW, Draganov DI. Dominant Role of Paraoxonases in Inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Infect Immun* 2008; **76**: 2512-2519 [PMID: 18347034 DOI: 10.1128/IAI.01606-07]
- 143 **Levy E**, Trudel K, Bendayan M, Seidman E, Delvin E, Elchebly M, Lavoie J-C, Precourt L-P, Amre D, Sinnett D. Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; **293**: G1252-G1261 [PMID: 17916643 DOI: 10.1152/ajpgi.00369.2007]
- 144 **Rothem L**, Hartman C, Dahan A, Lachter J, Eliakim R, Shamir R. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med* 2007; **43**: 730-739 [PMID: 17664137 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.003]
- 145 **Karban A**, Hartman C, Eliakim R, Waterman M, Nesher S, Barnett-Griness O, Shamir R. Paraoxonase (PON) 1 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2007; **52**: 2707-2715 [PMID: 17436100 DOI: 10.1007/s10620-006-9700-5]
- 146 **Britton RA**, Young VB. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology* 2014; **146**: 1547-1553 [PMID: 24503131 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.01.059]
- 147 **Maeda Y**, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M. Dysbiosis contributes to arthritis development

via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis Rheumatol* 2016; **68**: 2646-2661 [PMID: 27333153 DOI: 10.1002/art.39783]

148 **Quevrain E**, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermudez-Humaran LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill JP, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 2016; **65**: 415-425 [PMID: 26045134 DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307649]

149 **Sokol H**, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J. Low Counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in Colitis Microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009; **15**: 1183-1189 [PMID: 19235886 DOI: 10.1002/ibd.20903]

150 **Sokol H**, Jegou S, McQuitty C, Straub M, Leducq V, Landman C, Kirchgesner J, Le Gall G, Bourrier A, Nion-Larmurier I. Specificities of the intestinal microbiota in patients with inflammatory bowel disease and *Clostridium difficile* infection. *Gut microbes* 2018; **9**: 55-60 [PMID: 28786749 DOI: 10.1080/19490976.2017.1361092]

151 **Vila AV**, Imhann F, Collij V, Jankipersadsing SA, Gurry T, Mujagic Z, Kurilshikov A, Bonder MJ, Jiang X, Tigchelaar EF. Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Sci Transl Med* 2018; **10**: eaap8914 [PMID: 30567928 DOI: 10.1126/scitranslmed.aap8914]

152 **Cammarota G**, Ianiro G, Kelly CR, Mullish BH, Allegretti JR, Kassam Z, Putignani L, Fischer M, Keller JJ, Costello SP. International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 2019; **68**: 2111-2121 [PMID: 31563878 DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319548]

153 **Van Nood E**, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013; **368**: 407-415 [PMID: 23323867 DOI: 10.1056/NEJMoa1205037]

- 154 **Wu S**, Liu J, Liu C, Yang A, Qiao J. Quorum sensing for population-level control of bacteria and potential therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2020; **77**: 1319-1343 [PMID: 31612240 DOI: 10.1007/s00018-019-03326-8]
- 155 **Novick RP**, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S, Novick RP. Theagr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 446-458 [PMID: 7565609 DOI: 10.1007/BF02191645]
- 156 **Autret N**, Raynaud C, Dubail I, Berche P, Charbit A. Identification of the agr locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect Immun* 2003; **71**: 4463-4471 [PMID: 12874326 DOI: 10.1128/IAI.71.8.4463-4471.2003]
- 157 **Ohtani K**, Yuan Y, Hassan S, Wang R, Wang Y, Shimizu T. Virulence Gene Regulation by the agr System in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 2009; **191**: 3919-3927 [PMID: 19363118 DOI: 10.1128/jb.01455-08]
- 158 **Sifri CD**, Mylonakis E, Singh KV, Qin X, Garsin DA, Murray BE, Ausubel FM, Calderwood SB. Virulence Effect of *Enterococcus faecalis* Protease Genes and the Quorum-Sensing Locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and Mice. *Infect Immun* 2002; **70**: 5647-5650 [PMID: 12228293 DOI: 10.1128/iai.70.10.5647-5650.2002]
- 159 **Magnuson R**, Solomon J, Grossman AD. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* 1994; **77**: 207-216 [PMID: 8168130 DOI: 10.1016/0092-8674(94)90313-1]
- 160 **Mok KC**, Wingreen NS, Bassler BL. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *EMBO J* 2003; **22**: 870-881 [PMID: 12574123 DOI: 10.1093/emboj/cdg085]
- 161 **Waters CM**, Bassler BL. The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes Dev* 2006; **20**: 2754-2767 [PMID: 17015436 DOI: 10.1101/gad.1466506]
- 162 **Gambello MJ**, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 1991; **173**: 3000-3009 [PMID: 1902216 DOI: 10.1128/jb.173.9.3000-3009.1991]
- 163 **Gambello MJ**, Kaye S, Iglewski BH. *LasR* of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of

exotoxin A expression. *Infect Immun* 1993; **61**: 1180-1184 [PMID: 8454322 DOI: 10.1128/iai.61.4.1180-1184.1993]

164 **Winson MK**, Camara M, Latifi A, Foglino M, Chhabra SR, Daykin M, Bally M, Chapon V, Salmond G, Bycroft BW. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9427-9431 [PMID: 7568146 DOI: 10.1073/pnas.92.20.9427]

165 **Chapon-Hervé V**, Akrim M, Latifi A, Williams P, Lazdunski A, Bally M. Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997; **24**: 1169-1178 [PMID: 9218766 DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.4271794.x]

166 **Pesci EC**, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11229-11234 [PMID: 10500159 DOI: 10.1073/pnas.96.20.11229]

167 **Gallagher LA**, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C. Functions Required for Extracellular Quinolone Signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2002; **184**: 6472-6480 [PMID: 12426334 DOI: 10.1128/jb.184.23.6472-6480.2002]

168 **Bredenbruch F**, Geffers R, Nimtz M, Buer J, Häussler S. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ Microbiol* 2006; **8**: 1318-1329 [PMID: 16872396 DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01025.x]

169 **Diggle SP**, Matthijs S, Wright VJ, Fletcher MP, Chhabra SR, Lamont IL, Kong X, Hider RC, Cornelis P, Cámara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. *Chem Biol* 2007; **14**: 87-96 [PMID: 17254955 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.014>]

170 **Cao H**, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme LG. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 14613-14618 [PMID: 11724939 DOI: 10.1073/pnas.251465298]

- 171 **Diggle SP**, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M, Williams P. 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. *Mol Microbiol* 2003; **50**: 29-43 [PMID: 14507361 DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03672.x]
- 172 **Lee J**, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, Chang C, Dong Y, Williams P, Zhang L-H. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol* 2013; **9**: 339-343 [PMID: 23542643 DOI: 10.1038/nchembio.1225]
- 173 **Ng W-L**, Perez LJ, Wei Y, Kraml C, Semmelhack MF, Bassler BL. Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems. *Mol Microbiol* 2011; **79**: 1407-1417 [PMID: 21219472 DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07548.x]
- 174 **Walters M**, Sperandio V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* 2006; **296**: 125-131 [PMID: 16487745 DOI: 10.1016/j.ijmm.2006.01.041]
- 175 **Schauder S**, Shokat K, Surette MG, Bassler BL. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 2001; **41**: 463-476 [PMID: **11489131** DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02532.x]
- 176 **Zhu J**, Miller MB, Vance RE, Dziejman M, Bassler BL, Mekalanos JJ. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 3129-3134 [PMID: 11854465 DOI: 10.1073/pnas.052694299]
- 177 **Hammer BK**, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 2003; **50**: 101-104 [PMID: 14507367 DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x]
- 178 **Bansal T**, Jesudhasan P, Pillai S, Wood TK, Jayaraman A. Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; **78**: 811-819 [PMID: 18256823 DOI: 10.1007/s00253-008-1359-8]

- 179 **Choi J**, Shin D, Kim M, Park J, Lim S, Ryu S. LsrR-mediated quorum sensing controls invasiveness of *Salmonella typhimurium* by regulating SPI-1 and flagella genes. *PLoS One* 2012; **7**: e37059 [PMID: 22623980 DOI: 10.1371/journal.pone.0037059]
- 180 **Bao L**, Yu J, Zhong H, Huang D, Lu Q. Expression of toll-like receptors in T lymphocytes stimulated with N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 2017; **125**: 553-557 [PMID: 28418096 DOI: 10.1111/apm.12690]
- 181 **Glucksam-Galnoy Y**, Sananes R, Silberstein N, Krief P, Kravchenko VV, Meijler MM, Zor T. The bacterial quorum-sensing signal molecule N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone reciprocally modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in activated macrophages. *J Immunol* 2013; **191**: 337-344 [PMID: 23720811 DOI: 10.4049/jimmunol.1300368]
- 182 **Zhang J**, Gong F, Li L, Zhao M, Song J. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by activating the unfolded protein response. *Biomed Rep* 2014; **2**: 233-238 [PMID: 24649102 DOI: 10.3892/br.2014.225]
- 183 **Holm A**, Magnusson KE, Vikstrom E. *Pseudomonas aeruginosa* N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine Lactone Elicits Changes in Cell Volume, Morphology, and AQP9 Characteristics in Macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; **6**: 32 [PMID: 27047801 DOI: 10.3389/fcimb.2016.00032]
- 184 **Krishnan S**, Ding Y, Saedi N, Choi M, Sridharan GV, Sherr DH, Yarmush ML, Alaniz RC, Jayaraman A, Lee K. Gut microbiota-derived tryptophan metabolites modulate inflammatory response in hepatocytes and macrophages. *Cell Rep* 2018; **23**: 1099-1111 [PMID: 29694888 DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.109]
- 185 **Boontham P**, Robins A, Chandran P, Pritchard D, Cámara M, Williams P, Chuthapisith S, McKechnie A, Rowlands BJ, Eremin O. Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clin Sci* 2008; **115**: 343-351 [PMID: 18363571 DOI: 10.1042/CS20080018]
- 186 **Karlsson T**, Musse F Fau - Magnusson K-E, Magnusson Ke Fau - Vikstrom E, Vikstrom E. N-Acylhomoserine lactones are potent neutrophil chemoattractants that

act via calcium mobilization and actin remodeling. *J Leukoc Biol* 2012; **91**: 15-26 [PMID: 21807742 DOI: 10.1189/jlb.0111034]

187 **Zimmermann S**, Wagner C, Müller W, Brenner-Weiss G, Hug F, Prior B, Obst U, Hänsch GM. Induction of Neutrophil Chemotaxis by the Quorum-Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Infect Immun* 2006; **74**: 5687-5692 [PMID: 16988244 DOI: 10.1128/iai.01940-05]

188 **Singh PK**, Yadav VK, Kalia M, Sharma D, Pandey D, Agarwal V. Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in neutrophils through calcium signaling. *Med Microbiol Immunol* 2019; **208**: 855-868 [PMID: 31377870 DOI: 10.1007/s00430-019-00631-8]

189 **Wagner C**, Zimmermann S, Brenner-Weiss G, Hug F, Prior B, Obst U, Hänsch GM. The quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Anal Bioanal Chem* 2007; **387**: 481-487 [PMID: 16906383 DOI: 10.1007/s00216-006-0698-5]

190 **Gupta RK**, Chhibber S, Harjai K. Acyl homoserine lactones from culture supernatants of Pseudomonas aeruginosa accelerate host immunomodulation. *PLoS One* 2011; **6**: e20860 [PMID: 21698201 DOI: 10.1371/journal.pone.0020860]

191 **Hooi DS**, Bycroft BW, Chhabra SR, Williams P, Pritchard DI. Differential immune modulatory activity of Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecules. *Infect Immun* 2004; **72**: 6463-6470 [PMID: 15501777 DOI: 10.1128/IAI.72.11.6463-6470.2004]

192 **Cervantes-Barragan L**, Chai JN, Tianero MD, Di Luccia B, Ahern PP, Merriman J, Cortez VS, Caparon MG, Donia MS, Gilfillan S. Lactobacillus reuteri induces gut intraepithelial CD4⁺ CD8 α ⁺ T cells. *Science* 2017; **357**: 806-810 [PMID: 28775213 DOI: 10.1126/science.aah5825]

193 **Aoki R**, Aoki-Yoshida A, Suzuki C, Takayama Y. Indole-3-Pyruvic Acid, an Aryl Hydrocarbon Receptor Activator, Suppresses Experimental Colitis in Mice. *J Immunol* 2018; **201**: 3683-3693 [PMID: 30429284 DOI: 10.4049/jimmunol.1701734]

- 194 **Ritchie AJ**, Yam AOW, Tanabe KM, Rice SA, Cooley MA. Modification of In Vivo and In Vitro T- and B-Cell-Mediated Immune Responses by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-Homoserine Lactone. *Infect Immun* 2003; **71**: 4421-4431 [PMID: 12874321 DOI: 10.1128/iai.71.8.4421-4431.2003]
- 195 **Zelante T**, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P, Romani L. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 2013; **39**: 372-385 [PMID: 23973224 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.08.003]
- 196 **Smith RS**, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH, Phipps RP. 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* 2001; **167**: 366-374 [PMID: 11418672 DOI: 10.4049/jimmunol.167.1.366]

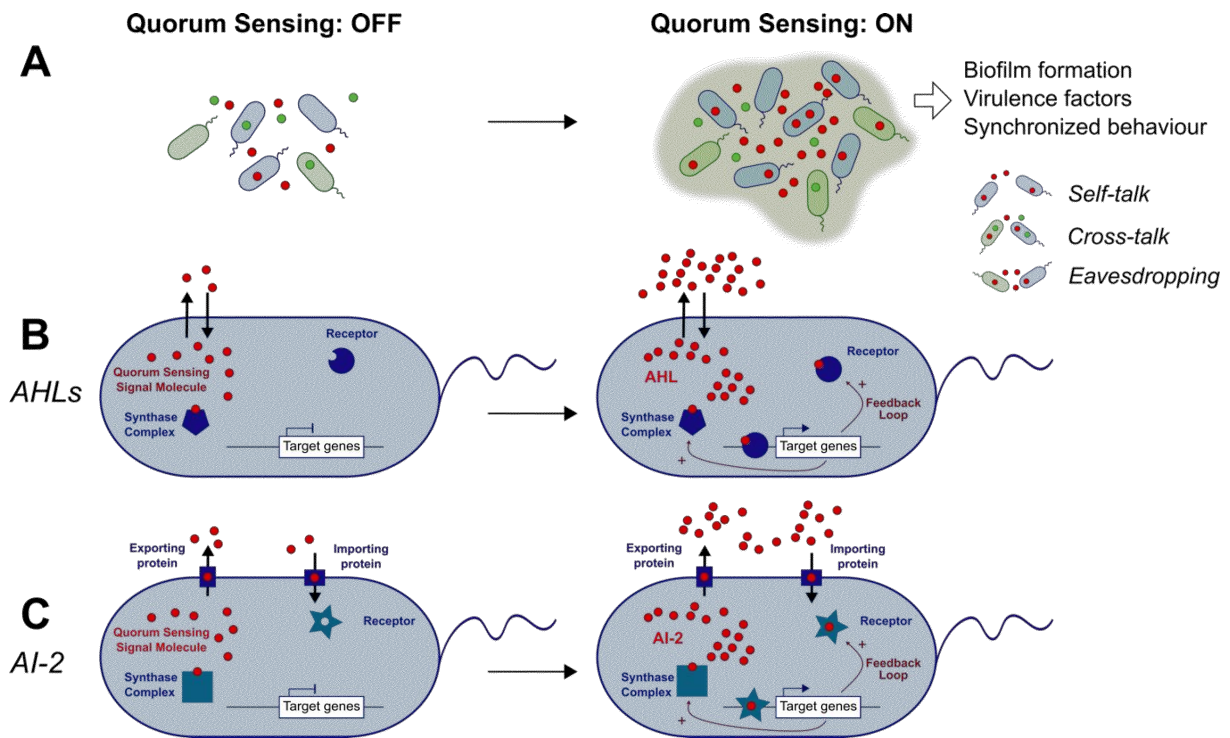


Figure 1: Main known mechanisms of quorum sensing activation in bacteria. **A:** Quorum sensing (QS) signaling depends on the release of autoinducers (AIs) in the environment. Above a threshold concentration depending on bacterial density, QS is activated and triggers gene expression. QS can be classified into three categories: self-talk (i.e., one species “talking” to itself), crosstalk (i.e., different species communicating using common AI), and eavesdropping, which refers to “listening” by species unable to produce AI by itself. **B:** The acyl-homoserine lactone (AHL) used by gram-negative bacteria is produced by the synthase complex, and AHL can freely diffuse through the membrane. AHL is recognized by its intracellular receptor, and the complex binds to target gene regulatory elements. **C:** The AI-2 system is used by both Gram-negative and Gram-positive bacteria. AI-2 needs a transporter protein to exit and enter the cell. For both AHLs and AI-2, there is a positive feedback loop, allowing the expression of the synthase complex and receptor of AI.

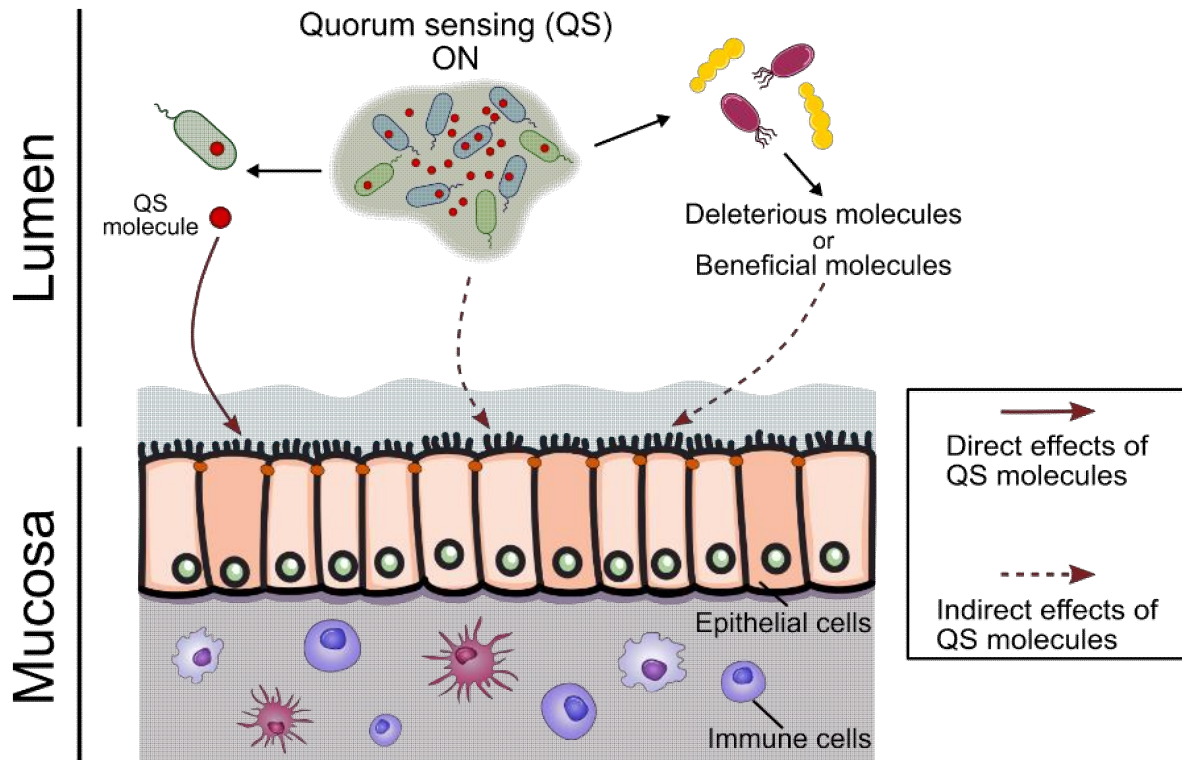


Figure 2: Interkingdom dialog between bacteria and the host through quorum sensing molecules. When reaching a threshold concentration within a bacterial community, quorum sensing (QS) autoinducers synchronize group behaviors such as virulence and attachment-effacement strategies as in enterohemorrhagic *Escherichia coli*, thus directly affecting the host (dotted line arrow, middle). QS molecules can impact the host through direct contacts (full arrow, left) with host cells, such as epithelial or immune cells, as has been extensively shown for the *Pseudomonas aeruginosa* QS molecule 3-oxo-C12-HSL, which freely enters mammalian cells. In addition, QS molecules can indirectly modify the host (dotted line arrow, right) through effects on other bacterial populations with different metabolic properties.

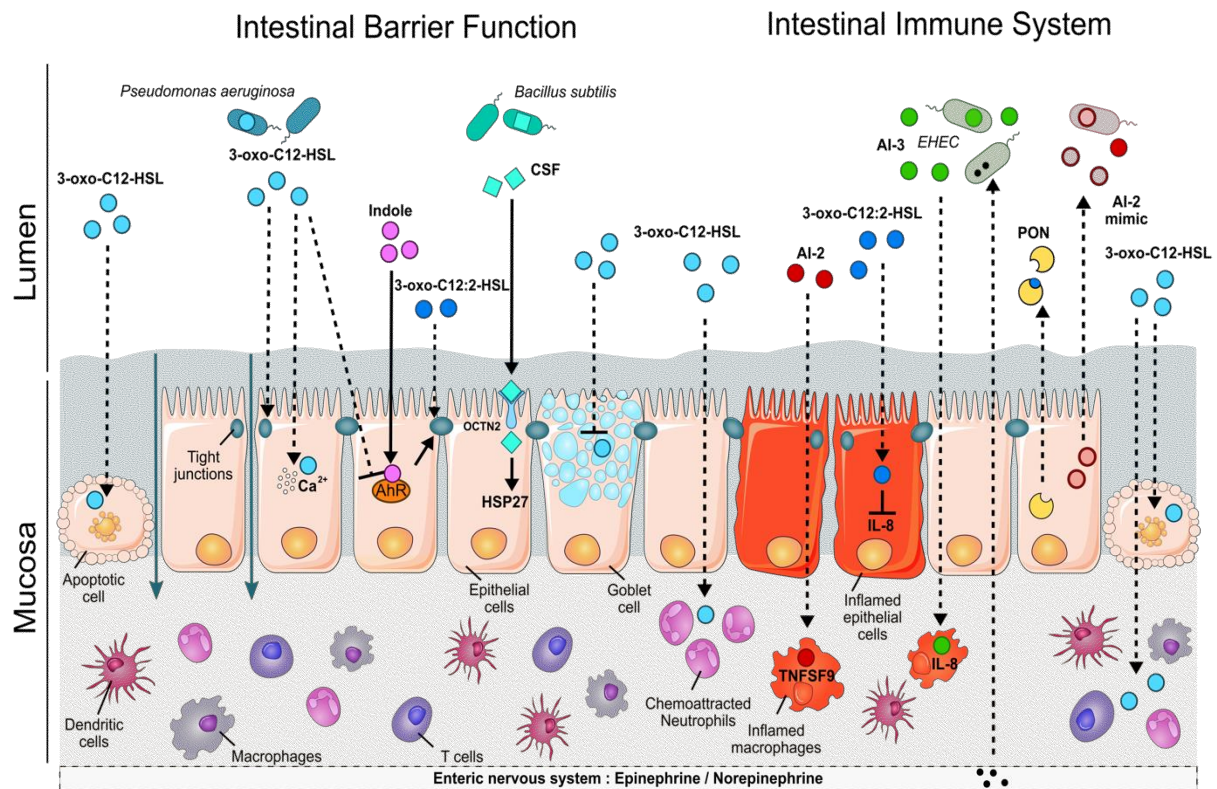


Figure 3: Effects of quorum sensing molecules on intestinal barrier function (see Table 2) and on the immune response (see Table 3). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing (QS) molecule 3-oxo-C12-HSL induces apoptosis in various cell types, including epithelial cells, promoting a breach in the intestinal barrier. In addition, 3-oxo-C12-HSL disrupts tight junctions, thus leading to increased paracellular permeability, and affects mucin production. Conversely, intestinal AHL 3-oxo-C12:2-HSL and the tryptophan metabolite indole protect tight junctions. *Bacillus subtilis* competence and sporulation factor (CSF), which binds to OCTN2, also promotes intestinal barrier integrity by reducing cell death through activation of HSP27 signaling. While 3-oxo-C12-HSL stimulates chemoattraction and phagocytosis in neutrophils and induces cell death, its pro- or anti-inflammatory effects on immune cells are more complex (see Table 3). AI-2 and AI-3 both exert proinflammatory effects on macrophages by inducing the expression of the immune mediators TNFSF9 and IL-8, respectively, whereas 3-oxo-C12:2-HSL reduces IL-8 production by epithelial cells. It remains to be clarified how all these QS molecules could cross the intestinal barrier and/or reach immune cells *in vivo* in a physiological context, as illustrated by dotted lines. Last, just as QS molecules can impact eukaryotic cells, the host can interfere with QS: the hormones epinephrine/norepinephrine bind to the AI-3 receptor in EHEC; intestinal epithelial cells secrete an AI-2 mimic in addition to paraoxonase (PON) enzymes degrading homoserine lactones.

Table 1: Examples of bacterial quorum sensing autoinducer and corresponding systems

	Autoinducer (AI)	Example of producing bacteria	QS system	Bacterial QS-regulated processes	Ref.	
Gram +	Autoinducer Peptide (AIP)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>agr</i>	Virulence	[155]	
		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>agr</i>	Virulence	[156]	
		<i>Clostridium perfringens</i>	<i>agr</i>	Virulence	[157]	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>FsR</i>	Virulence	[158]	
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>com</i>	Competence	[159]	
Y-butyrolactone		<i>Streptomyces</i> genus	<i>scb</i>	Antibiotics	[13]	
			<i>scg</i>	Metabolism	[14]	
Gram -	AI-1 (Acyl-Homoserine Lactones)	<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI/LuxR	Luminescence	[16]	
		<i>Vibrio harveyi</i>	LuxLM/LuxN	Luminescence & Virulence	[160] [161]	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI/LasR RhII/RhIR	Virulence & Biofilm	[162-165]	
	PQS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PqsABCD/ PqsR	QS regulation	[166]	
				Pyocyanin	[167]	
				Iron homeostasis Virulence Biofilm	[168, 169] [167, 170] [171]	
	IQS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AmbBCDE/ IqsR	Response to stress	[172]	
	CAI	<i>Vibrio (cholerae)</i>	CqsA/CqsS	Virulence	[173]	
	AI-3		EHEC O157:H7	Qse/QseBC	Attachment-Effacement	[19, 21, 22]
			EPEC O26:H11	Qse/ Unknown	Unknown	[22, 40]
AIEC LF82			Qse/ Unknown	Unknown	[22]	
<i>Escherichia coli</i> MG1655			Unknown	Unknown	[22]	
<i>Escherichia coli</i> BW25113			Unknown	Unknown	[22]	
<i>Salmonella enterica</i>			Qse/Unknown	Unknown	[22, 40, 174]	
<i>Shigella flexneri</i>	Qse/Unknown	Unknown	[22, 40, 174]			
<i>Yersinia sp.</i>	Qse/Unknown	Unknown	[22, 40, 174]			
Gram + & -	AI-2	<i>Vibrio harveyi</i>	LuxS/LuxPQ	Bioluminescence, TSS, protease	[24, 160, 175]	
		<i>Vibrio cholerae</i>	LuxS/LuxPQ	Virulence & Biofilm	[175, 176, 177]	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	LuxS/LuxPQ	Unknown	[24, 175]	
		EHEC	LuxS/LsrB (?)	Attachment-Effacement	[175, 178]	
		<i>Salmonella enterica</i>	LuxS/LsrB	Pathogenicity & invasion	[26, 175, 179]	

Table 2: Effects of QS molecules on different parameters of the intestinal epithelial barrier function

QS molecule	Effects	Ref.
Effects on the intestinal epithelial migration		
3-oxo-C12-HSL	Increased migration at low concentrations (1.5-12µM) vs. inhibition at 200µM	[72]
	Interaction with IQGAP1 and increase in Rac1/Cdc42 (1.5-200µM)	[72]
Effects on the intestinal epithelial permeability and intercellular junctions		
3-oxo-C12-HSL	Increased permeability to ions and macromolecules (100-400µM)	[55, 58-61]
	Activation of p38 and p42/44 and calcium signaling (100-200µM)	[58-60]
	Decreased expression levels of tight junction genes (100-400µM)	[55, 58-61]
	Disassembly of tight and adherens junctions (modification of their phosphorylation status and involvement of MMP-2 and -3)	
	Decreased levels of tight junction proteins occludin and tricellulin (100-400µM)	[55]
Decreased protein levels of extracellular matrix and tight junction proteins (400µM)	[62]	
3-oxo-C12:2-HSL	No deleterious effects on permeability Protection of tight junction integrity and maintenance of junctional complexes at the plasma membrane under pro-inflammatory conditions	[39, 61]
3-oxo-C14-HSL	Decreased protein levels of extracellular matrix and tight junction proteins (400µM)	[62]
Indole & indole derivatives	Decreased permeability to ions and increased expression of genes coding tight junction and cytoskeleton proteins	[76, 77]
	Decreased permeability to macromolecules	[79]
	Increased transcripts levels of genes coding tight junction proteins	[78]
Effects on the mucus layer components		
3-oxo-C12-HSL	Decreased MUC3 mRNA levels (30µM)	[70]
	Decrease in Muc2 production in goblet cell-like cell line (100µM) vs. increase in colonic cell line (400µM)	[67]
Indole	Increased expression of genes involved in the production of mucins	[76]
Effects on intestinal epithelial cell viability		
3-oxo-C12-HSL	Mitochondrial dysfunction and induction of apoptosis in goblet cell-like cell line (100µM) and in colonic cell line (30-100µM)	[67-70]
	Induction of apoptosis, mitochondrial dysfunction, oxidative stress and blocking of cell cycle (400µM)	[62]
3-oxo-C14-HSL	Induction of apoptosis, mitochondrial dysfunction, oxidative stress and blocking of cell cycle (400µM)	[55, 58-62]
CSF	Reduction of oxidative stress-induced cell death and loss of the epithelial barrier (involving HSP27 and p38/MAPK pathway)	[74]

Table 3: Effects of quorum sensing molecules on inflammation in different cell types

Cell type	QS molecule	Effects	Ref.
Effects on innate immune cells			
Macrophages	3-oxo-C12-HSL	Anti-inflammatory effects on IL-12 and TNF α (0.1-100 μ M)	[94]
		Increased TLR2 and TLR4 expression and decreased TNF α production (1-100 μ M)	[180]
		Pro-apoptotic effects (12-50 μ M)	[102]
		Increased phagocytosis (100 μ M)	[107]
		NF- κ B inhibition (4.7 μ M)	[104]
		Dose-dependent anti-inflammatory effects (1-50 μ M)	[105]
		Involvement in p38/MAPK signaling (1-100 μ M)	[105, 107, 181]
		Activation of the Unfolded Protein Response (6.25-100 μ M)	[182]
		Change in cell volume and shape (10-50 μ M)	[183]
		Indole derivatives	Prevents the induction of pro-inflammatory cytokines
	AI-2	Induction of the expression of cytokines, chemokines and TNFSF9	[41]
Monocytes	AI-3 and analogues	Increase in IL-8 secretion	[22]
Dendritic cells	3-oxo-C12-HSL	Pro-apoptotic effects (100 μ M)	[185]
		No effect on IL-10 secretion (5-30 μ M)	[100]
		Increased IL-10 production (5-100 μ M)	[99]
		Decreased IL-12 secretion (5-100 μ M)	[99, 100]
		Increased induction of Treg (5-100 μ M)	[99]
Neutrophils	3-oxo-C12-HSL	Chemoattraction (0.01-100 μ M)	[186, 187]
		Activation of MAPK signaling (12-50 μ M)	[102, 188]
		Increased phagocytosis (10 μ M)	[189]
		Pro-apoptotic effects (12-50 μ M)	[102]
Effects on adaptive immune cells			
T cells	3-oxo-C12-HSL	Inhibition of proliferation and activation (0.1-100 μ M)	[94, 185, 190, 191]
		Activation of naïve T cells towards Th1 phenotype (5 μ M)	[95]
		Decreased secretion of IL-4 and IFN γ (5 μ M)	[96]
		Induction of apoptosis via the mitochondria pathway (100 μ M)	[101]
		Induction of Treg (1-50 μ M)	[99]
	Indole derivatives	Re-programming into tolerogenic T cells	[192]
		Promotion of differentiation towards a regulatory type 1 phenotype	[193]
B cells	3-oxo-C12-HSL	Modulation of immunoglobulin production (0.1-100 μ M)	[94, 194]
ILC	Indole derivatives	Promotion of IL-22 production	[195]
Effects on epithelial cells			
Pulmonary tract epithelial cells	3-oxo-C12-HSL	Induction of IL-8 production and NF- κ B activation (100 μ M)	[196]
		Increased expression levels of pro-inflammatory cytokines	[115]
Intestinal epithelial cells	3-oxo-C12-HSL	Mitigation (1-10 μ M) or aggravation (>50 μ M) of IL-8 expression induction	[92]
	3-oxo-C12:2-HSL	Attenuation of the induction of IL-8 expression (5-50 μ M)	[39]