



**HAL**  
open science

**L'utilisation de *Lactococcus lactis* recombinant  
promouvant l'expression de peptides antimicrobiens  
pour le traitement de l'inflammation dans l'intestin :  
Interactions hôte-microbiote**

Esther Borrás Nogués Borrás Nogués

► **To cite this version:**

Esther Borrás Nogués Borrás Nogués. L'utilisation de *Lactococcus lactis* recombinant promouvant l'expression de peptides antimicrobiens pour le traitement de l'inflammation dans l'intestin : Interactions hôte-microbiote. Alimentation et Nutrition. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASB038 . tel-03826831

**HAL Id: tel-03826831**

**<https://theses.hal.science/tel-03826831v1>**

Submitted on 24 Oct 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.

L'utilisation de *Lactococcus lactis* recombinant  
promouvant l'expression de peptides  
antimicrobiens pour le traitement de  
l'inflammation dans l'intestin : Interactions  
hôte-microbiote

*Recombinant Lactococcus lactis as a vector of expression of antimicrobial  
peptides in the treatment of gut inflammation: Host-microbiota  
interactions*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé  
(ABIES)

Spécialité de doctorat : Sciences de la nutrition

Graduate School : Biosphera. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Micalis Institute** (Université Paris-Saclay,  
INRAE, AgroParisTech), sous la direction de **Jean-Marc CHATEL**, Directeur de  
recherche

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 juin 2022, par**

**Esther BORRAS NOGUÈS**

**Composition du Jury**

<b>Stéphanie BURY-MONE</b> Professeure des universités, Université Paris-Saclay	Présidente du Jury
<b>Hubert VIDAL</b> Directeur de Recherche, INSERM (Université de Lyon)	Rapporteur & Examineur
<b>Anne-Judith WALIGORA</b> Maîtresse de Conférences (HDR), Université Paris-Cité	Rapporteur & Examinatrice
<b>Fredéric CARVALHO</b> Chargé de Recherche, INSERM (Université Clermont Auvergne)	Examineur
<b>Lhousseine TOUQUI</b> Directeur de Recherche, Institut Pasteur	Examineur
<b>Jean-Marc CHATEL</b> Directeur de Recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)	Directeur de thèse

**Titre :** L'utilisation de *Lactococcus lactis* recombinant promouvant l'expression de peptides antimicrobiens pour le traitement de l'inflammation dans l'intestin : Interactions hôte-microbiote

**Mots clés :** Inflammation, peptide antimicrobien, microbiote intestinal, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), obésité

**Résumé :** Le microbiote intestinal est un écosystème de microorganismes dont les nombreuses fonctions digestives et immunitaires le rendent indispensable à la bonne santé de son hôte. Une susceptibilité génétique associée à des perturbations environnementales peut rompre cet équilibre et entraîner une dysbiose. L'inflammation chronique en résultant se traduit en différents troubles locaux et systémiques. Ainsi la dysbiose a été mise en cause dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et également au développement de troubles métaboliques associés à l'obésité.

Les peptides antimicrobiens sont des molécules du système immunitaire innée ayant des fonctions de

contrôle de la population bactérienne au niveau de la barrière intestinale et empêchant le contact direct entre celles-ci et les cellules épithéliales.

L'objectif de cette thèse est d'étudier le potentiel thérapeutique des peptides antimicrobiens dans le traitement de maladies liées à la dysbiose comme les MICI et le syndrome métabolique. Pour cela *Lactococcus lactis*, une bactérie lactique interagissant de manière transitoire avec la barrière épithéliale intestinale, a été utilisée comme vecteur de la molécule d'intérêt. Durant cette thèse j'ai pu établir que la cathélicidine humaine (hCAP18) et REG3A avaient un impact sur le microbiote et amélioraient les symptômes de la colite induite et de l'obésité chez le rongeur.

**Title:** Recombinant *Lactococcus lactis* as a vector of expression of antimicrobial peptides in the treatment of gut inflammation: Host-microbiota interactions.

**Keywords:** Inflammation, antimicrobial peptides, gut microbiota, inflammatory bowel diseases (IBD), obesity

**Abstract:** Intestinal microbiota is an ecosystem of microorganisms with many digestive and immune functions, which are vital for its host's health. Genetic susceptibility and environmental disturbances break this balance and lead to dysbiosis of the gut microbiota, which was linked to chronic inflammation and many associated disorders like inflammatory bowel diseases and obesity-associated conditions such as type-2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular diseases

Antimicrobial peptides are part of the innate immune system and a key component for the control of bacterial population at the epithelial barrier.

They prevent direct contact between gut microbes and host cells.

In this thesis, I study the therapeutic potential of antimicrobial peptides against inflammatory bowel disease and metabolic syndrom, two dysbiosis-related conditions. I use recombinant *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacteria allowing transient interaction with the epithelial barrier, as a vector for our molecules of interest: human cathelicidin (hCAP18) and REG3A. I show that these peptides ameliorate chemically induced colitis and obesity in mice.

## Remerciements

Je voudrais commencer par remercier mon directeur de thèse, Jean-Marc Chatel, pour son soutien, ses conseils et sa gentillesse durant ces années de thèse.

Je remercie tous les membres de mon comité de thèse, Philippe Seksik, Lhousseine Touqui et Sébastien André, pour avoir accepté de m'encadrer et me conseiller durant cette thèse.

Je remercie également les membres du jury pour la lecture et correction de cette thèse ainsi que leur présence et leur bienveillance durant ma soutenance.

Je remercie Philippe Langella pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et permis de mener ce projet à bien.

Je remercie tous mes collègues de ProbiHôte qui m'ont fourni de précieux conseils et aidée à la réalisation de ce travail. Je remercie également Aurélia Bruneau, Sead Chadi, Anne-Sophie Boucard, Edgar Torres ainsi que toutes les autres personnes qui m'ont aidée pendant le déroulement des manips. Je remercie notamment Florain Chain et Camille Kropp pour m'avoir apporté leurs conseils et leur aide constante en manips animales. Je remercie aussi Allison Agus, Chloé Michaudel et Gregory Da-Costa pour leurs conseils. Je remercie également Léa Graci, venue en stage chez nous pour son diplôme de licence, pour l'aide qu'elle m'a apportée et la qualité de son travail.

Je tiens à remercier spécialement Sophie Gontier, Jade Loiseau, Anne Aucouturier et Sandrine Auger pour toutes les conversations et le soutien moral qu'elles m'ont apporté. Je remercie aussi tous les autres collègues, permanents ou de passage, avec qui j'ai échangé de bons moments de discussion qui ont rendu le quotidien plus agréable. Aurélie, Giovanna, Camille, Anne-Sophie, Flore, Nicolas, Luis, Lise S., Lise M., Simon, Greg, Marie, Célia, ainsi que beaucoup d'autres. La liste est beaucoup trop longue pour la faire entièrement !

Je remercie ma collègue de l'Université Fédérale de Minas Gerais, Tatiani Maioli, pour les conseils et l'aide qu'elle m'a apporté pour ma première expérience sur modèle d'obésité lors de son passage chez nous.

Je souhaite également remercier mes collègues de la plateforme @BRIDGE. Marthe Vilotte et Julie Rivière pour l'histologie et Marie-Noelle Rossignol pour la génomique.

Je remercie enfin tout le personnel de l'animalerie pour leur travail et leur aide précieuse.



# Table des matières

REMERCIEMENTS .....	1
ABREVIATIONS .....	7
LISTE DES PUBLICATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES DE L'INTRODUCTION .....	10
INTRODUCTION GENERALE .....	13
I. L'INFLAMMATION DE L'INTESTIN ET LA DYSBIOSE .....	15
<i>I.1) Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....</i>	<i>15</i>
I.1.A) Présentation générale des Maladies inflammatoires Chroniques de l'Intestin .....	15
I.1.A.a) Epidémiologie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin .....	16
I.1.A.b) Diagnostic et prise en charge des MICI.....	18
I.1.B) Facteurs de risques des MICI .....	20
I.1.B.a) Facteurs de risques génétiques .....	20
I.1.B.b) Facteurs de risques environnementaux.....	21
I.1.C) Physiopathologie des MICI .....	24
I.1.C.a) La perméabilité de la barrière intestinale .....	24
I.1.C.b) L'inflammation : acteur clé de la pathologie .....	25
I.1.D) Le rôle du microbiote intestinal dans les MICI.....	31
I.1.D.a) Définition et fonctions du microbiote intestinal.....	31
I.1.D.b) Etablissement et composition du microbiote intestinal sain .....	32
I.1.D.c) La dysbiose chez les patients atteints de MICI.....	33
I.1.D.d) La place du microbiote dans les stratégies thérapeutiques .....	35
I.1.E) Les modèles expérimentaux de colite .....	38
I.1.E.a) Les modèles génétiques .....	38
I.1.E.b) Les modèles immunologiques.....	38
I.1.E.c) Les modèles d'induction chimique .....	39
<i>I.2) L'inflammation chronique dans l'obésité .....</i>	<i>40</i>
I.2.A) Présentation générale de l'obésité et ses enjeux .....	40
I.2.A.a) Epidémiologie et enjeux socio-économiques de l'obésité.....	40
I.2.A.b) Facteurs génétiques et environnementaux dans le développement et le maintien de l'obésité.....	42
I.2.B) Physiopathologie de l'obésité et du diabète de type 2.....	46
I.2.B.a) Dérèglement hormonal du comportement alimentaire et du métabolisme énergétique.....	46
I.2.B.b) Alimentation, endotoxémie métabolique et développement de l'insulino-résistance .....	47
I.2.B.c) L'inflammation : acteur clé de la pathologie.....	49

I.2.C) Obésité et dysbiose .....	50
I.2.C.a) Interactions entre le microbiote intestinal et le métabolisme des nutriments .....	50
I.2.C.b) Obésité et composition du microbiote intestinal .....	53
I.2.C.c) La place du microbiote dans les stratégies thérapeutiques .....	54
I.2.D) Les modèles expérimentaux d'obésité .....	57
I.2.D.a) Les modèles monogénétiques .....	57
I.2.D.b) Les régimes sur-gras .....	57
I.3) Conclusion : L'inflammation de l'intestin et la dysbiose .....	59
II. LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS COMME TRAITEMENTS ANTI-INFLAMMATOIRES .....	60
II.1) Définition et classification des peptides antimicrobiens.....	60
II.1.A) Structure générale des PAMs.....	60
II.1.B) Les différentes classes de peptides antimicrobiens .....	60
II.1.B.a) Les défensines.....	60
II.1.B.b) Les histatines .....	61
II.1.B.c) Les cathélicidines .....	61
II.1.B.d) Les lectines de type-C de la famille Reg3 .....	62
II.1.C) Expression, induction et activation des PAMs .....	64
II.2) Les fonctions physiologiques des peptides antimicrobiens.....	66
II.2.A) Protection de la barrière intestinale contre les infections.....	66
II.2.A.a) Les défensines.....	67
II.2.A.b) hCAP18/LL37 .....	67
II.2.A.c) Les peptides REG3.....	68
II.2.B) Peptides antimicrobiens et modulation du système immunitaire .....	70
II.2.C) Peptides antimicrobiens et réparation des tissus .....	70
II.2.D) PAMs et maladies inflammatoires de l'intestin .....	71
II.2.E) PAMs et maladies métaboliques .....	71
II.3) Conclusion : Les PAMs comme stratégie thérapeutique de l'inflammation intestinale .....	72
III. L'UTILISATION DE PROBIOTIQUES COMME VECTEUR DE TRAITEMENT CIBLE AU NIVEAU DE LA BARRIÈRE INTESTINALE.....	73
III.1) Historique et définition d'un probiotique .....	73
III.2) Effets bénéfiques des bactéries lactiques de l'alimentation .....	75
III.3) Les bactéries lactiques recombinantes comme vecteurs de molécules thérapeutiques.....	76
III.A) <i>L. lactis</i> comme modèle d'expression .....	77
III.B) Systèmes d'expression d'un gène par <i>L. lactis</i> .....	77
III.C) L'utilisation de probiotiques comme vecteur de vaccins à ADN .....	79
III.4) Conclusion : L'utilisation des probiotiques comme vecteur de molécules thérapeutiques .....	80
<b>HYPOTHESES ET OBJECTIFS.....</b>	<b>81</b>
<b>CHAPITRE 1 : LACTOCOCCUS LACTIS RECOMBINANT EXPRIMANT CDNA-LL37 PROTEGE CONTRE</b>	
<b>L'INFLAMMATION INDUITE PAR LE DNBS DANS LE MODELE SOURIS.....</b>	<b>85</b>

<b>LACTOCOCCUS LACTIS ENGINEERED TO DELIVER hCAP18 CDNA ALLEVIATES DNBS-INDUCED COLITIS IN C57BL/6 MICE BY PROMOTING IL17A AND IL10 CYTOKINE EXPRESSION .....</b>	<b>87</b>
Keywords.....	87
INTRODUCTION.....	87
RESULTS.....	89
Delivery of hCAP18 cDNA alleviates DNBS-induced symptoms .....	89
Probi-H1:hCAP18 increases local IL10, IL17A production and reduces IFN- $\gamma$ secretion .....	90
Comparison of fecal microbiota composition among treatment groups .....	90
Effects on DNBS-induced colitis of fecal transplant from mice treated with LL-ProBi-H1:empty or LL-ProBi-H1:hCAP18 .....	91
DISCUSSION .....	91
MATERIALS AND METHODS.....	93
Plasmid cloning and <i>L. lactis</i> transformation .....	93
Bacterial strain preparation.....	94
Western blot .....	95
Experimental conditions for mice .....	95
<i>Lactococcus lactis</i> and DNBS treatment groups.....	95
PEG wash and fecal transplantation.....	95
Macroscopic scoring and histologic sampling .....	96
Myeloperoxidase activity in colon .....	96
mRNA extraction and qPCR .....	96
DNA extraction and 16S DNA sequencing.....	96
Statistical analysis of sequencing data .....	97
Statistical analysis of macroscopic symptoms and inflammatory markers.....	97
REFERENCES.....	97
ACKNOWLEDGMENTS .....	102
AUTHORS AFFILIATIONS.....	102
CONTRIBUTIONS .....	102
FUNDING.....	102
CONFLICTS OF INTERESTS/COMPETING INTERESTS.....	102
ETHICS APPROVAL .....	102
DATA AVAILABILITY AND MATERIALS .....	102
FIGURES LEGENDS .....	103
TABLES.....	104
FIGURES AND SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	106
<b>CHAPITRE 2 : REG3A ET IL22 ONT DES EFFETS OPPOSES SUR L'ACCUMULATION DES LIPIDES DANS LE FOIE DANS UN MODELE D'OBESETE INDUITE PAR REGIME SURGRAS.....</b>	<b>111</b>



<b>REG3A AND IL22 HAVE OPPOSITE EFFECTS ON FAT ACCUMULATION IN THE LIVER IN A MILK-FAT BASED HIGH-FAT DIET AND IMPACT GUT MICROBIOTA COMPOSITION .....</b>	<b>113</b>
ABSTRACT .....	113
BACKGROUND .....	113
MATERIAL AND METHODS .....	115
<i>Mice breeding conditions and food .....</i>	<i>115</i>
<i>IL-22 and REG3A expressing plasmids .....</i>	<i>116</i>
<i>Oral glucose tolerance test.....</i>	<i>116</i>
<i>Insulin tolerance test .....</i>	<i>116</i>
<i>Necropsy, tissue and blood sampling .....</i>	<i>116</i>
<i>Liver histology and hepatic lipids measurement .....</i>	<i>117</i>
<i>DNA extraction and 16S DNA sequencing .....</i>	<i>117</i>
<i>Analysis of sequencing data .....</i>	<i>117</i>
<i>Statistical analysis .....</i>	<i>117</i>
RESULTS .....	118
<i>REG3A reduced weight gain in MFD-fed mice .....</i>	<i>118</i>
<i>REG3A and IL-22 treatments alter insulin tolerance in different ways.....</i>	<i>118</i>
<i>IL-22 aggravates fat accumulation and damage in the liver of MFD-fed mice .....</i>	<i>118</i>
<i>MFD reduces fecal microbiota richness .....</i>	<i>119</i>
<i>Gut microbiota composition correlates with diet, L. lactis treatment and liver damage at OTU and genus levels.....</i>	<i>120</i>
<i>REG3A and IL-22 reverse Alistipes and Muribaculum increase due to MFD.....</i>	<i>120</i>
DISCUSSION .....	122
ACKNOWLEDGMENTS .....	123
FIGURES AND TABLES LEGENDS .....	123
SUPPLEMENTARY DATA.....	125
REFERENCES .....	125
<b>FIGURES, TABLES AND SUPPLEMENTARY MATERIAL.....</b>	<b>131</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>155</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>165</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>181</b>

## Abréviations

AIEC : *E. coli* adhérente invasive

ALAT : Alanine aminotransférase

AGCC : Acide gras à chaîne courte (SCFA en anglais)

ASAT : Aspartate aminotransférase

CCL et CXCL : Chemokines

CD45 : Cluster Differentiation 45 ou Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C

CFU : Colony Forming Unit

ChREBP : Carbohydrate response element binding protein

CPA: Cellules présentatrices d'antigènes

CRP : Protéine C-réactive (C-Reactive Protein)

DAMPs : Danger-Associated Molecular Patterns

DSS: Dextran Sodium Sulfate

FFAR3 : Free Fatty Acid Receptor 3

GR : Glucocorticoid receptor

HAS: La Haute Autorité de Santé est une autorité publique indépendante à caractère scientifique dont les missions comprennent l'évaluation des produits de santé et la mise en place des recommandations de bonne pratique

HBD : Human Beta Defensin

HNP1-4 : Human Neutrophil Peptide 1 à 4

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1

IFN- $\gamma$  : Interféron gamma

IKKi : Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase, inducible

IKKs : Inhibitory kappa B kinases

IL : Interleukine

IRAKs : Interleukin-1 receptor-associated kinase 1

IRF : Interferon regulatory transcription factor

LPS : Lipopolysaccharide

LT CD4+ : Lymphocytes T naïfs

LT CD8+ : Lymphocytes T cytotoxiques

MAL/TIRAP : MyD88 adaptor-like/TIR-containing adaptor protein

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MC : Maladie de Crohn

mCRAMP : mouse Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide

MD2 : Myeloid Differentiation factor 2

MHC : Major histocompatibility complex

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

MST1 : Macrophage Stimulating 1

NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease  
(maladie du foie gras)

NEE : Nutrition entérale exclusive

NFκB : Nuclear Factor-kappa B

NOD2 : Nucleotide-binding Oligomerization  
Domain 2

OTU : Operational Taxonomic Unit

PAMPs : Pathogens-Associated Molecular  
Patterns

PAMs : Peptides antimicrobiens (AMPs en  
anglais)

PBS : Phosphate-buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGN : Peptidoglycane

PPARγ : Peroxisome proliferator-activated  
receptors gamma

PRRs : Patter recognition receptors

RCH : Rectocolite hémorragique

REG3 : Regenerating islet-derived protein 3

RIP : Receptor-interacting protein kinases

SNC : Système nerveux central

SREBP : Sterol regulatory element-binding  
protein

Stress RE : Stress du réticulum endoplasmique.  
Lié à l'accumulation de protéines mal

conformées dans le RE conduisant à l'activation  
du système immunitaire.

TANK : TRAF family member associated NFKB  
activator

TBK1 : TANK Binding Kinase 1

TG : Triglycerides

TGF-β : Transforming Growth Factor beta

Th : T Helpers

TIR domain : Toll-interleukin receptor

TLR : Toll-Like Receptor

TNBS/DNBS: 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic  
acid/dinitrobenzene sulfonic acid

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

TRAF : Tumor necrosis factor receptor-  
associated factor

Treg : Lymphocytes T régulateurs

TRIF/TICAM-1 : TIR domain-containing adaptor  
inducing interferon-β/TIR domain-containing  
adaptor molecule 1

## Liste des publications

### En cours de publication

Esther Borrás Nogues, Camille Kropp, Laureline Bétemps, Cassiana de Sousa, Florian Chain, Sandrine Auger, Vasco Azevedo, Philippe Langella and Jean-Marc Chatel. **Lactococcus lactis engineered to deliver hCAP18 cDNA alleviates DNBS-induced colitis in C57BL/6 mice by promoting IL17A and IL10 cytokine expression.** Manuscrit soumis à Scientific reports.

Esther Borrás Nogues, Alisson Agus, Aurélia Bruneau, Florian Chain, Léa Graci, Philippe Langella and Jean-Marc Chatel. **REG3A and IL22 have opposite effects on fat accumulation in the liver in a milk-fat based high-fat diet.** A soumettre.

### Publiées

Tatiani Uceli Maioli+, Esther Borrás-Nogues+, Sara Candida Barbosa, Vinicius Dantas Martins, Licia Torres, Vasco Ariston Azevedo and Jean-Marc Chatel\*. **Possible Benefits of *Faecalibacterium prausnitzii* for Obesity-Associated Gut Disorders.** *Front. Pharmacol.*, 02 December 2021 | <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.740636>

Meynier Maëva, Baudu Elodie, Rolhion Nathalie, Defaye Manon, Straube Marjolène, Daugey Valentine, Modoux Morgane, Wawrzyniak Ivan, Delbac Frédéric, Villéger Romain, Méleine Mathieu, Borrás Nogues Esther, Godfraind Catherine, Barnich Nicolas, Ardid Denis, Poirier Philippe, Sokol Harry, Chatel Jean-Marc, Langella Philippe, Livrelli Valérie, Bonnet Mathilde, Carvalho Frédéric Antonio. **AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms.** *Gut Microbes.* Jan-Dec 2022;14(1):2022997. <https://doi:10.1080/19490976.2021.2022997>

Auger, S.; Kropp, C.; Borrás-Nogues, E.; Chanput,W.;Andre-Leroux, G.; Gitton-Quent, O.; Benevides, L.; Breyner, N.; Azevedo,V.; Langella, P.; et al. **Intraspecific Diversity of Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii*.** *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 1705. <https://doi.org/10.3390/ijms23031705>

## Liste des figures de l'introduction

Figure 1. Les différents types de MICI (traduit d'après Karma Yeshi et al. 2020).....	15
Figure 2. Incidence de la MC et de la RCH dans le monde (S. Ng, H. Shi, N. Hamidi et al. 2017) .....	17
Figure 3. Différents marqueurs génétiques impliquées dans les MICI (Bernard Khor, Agnès Gardet and Ramnik J. Xavier., 2011) .....	20
Figure 4. Les facteurs de risques environnementaux contribuant au développement des MICI (adapté de Ashwin N. Ananthkrishnan et al. 2017).....	23
Figure 5. Schéma de la muqueuse intestinale chez A) le patient sain et B) le patient atteint d'une MICI (traduit d'après Mario Matijašić et al. 2020).....	24
Figure 6. Schématisation de l'activation des voies de signalisation de Nod1, Nod2 et TLR4 (Naohiro Inohara, Mathias Chamaillard et al. 2005).....	26
Figure 7. Déséquilibre des cytokines pro et anti-inflammatoires chez les patients atteints de MC(traduit d'après S. Brand, 2009). .....	27
Figure 8. Réponse immunitaire Th2 atypique chez les patients atteints de RCH (Moldoveanu, Al C.Diculescu, M., Fierbinteanu Braticevici, C., 2015).....	28
Figure 9. Risque de développer le cancer colorectal entre 5 et 30 ans après le diagnostic d'une MICI (C D Gillen, R S Walmsley et al. 1994). .....	29
Figure 10. Rôle des cytokines de l'épithélium intestinal dans la guérison des tissus et le développement du cancer colorectal Markus F. Neurah, 2014).....	30
Figure 11. La composition du microbiote intestinal en fonction de l'emplacement dans le tube digestif (G.P. Donaldson, S. Melanie Lee & S.K. Mazmanian, 2015).....	31
Figure 12. Représentation schématique des entérotypes observés dans différentes études de composition du microbiote intestinal à travers le monde (Paul I. Costea et al. 2018).....	33
Figure 13. L'évolution de la complexité et la stabilité du microbiote intestinal au cours d'une vie et son lien à l'inflammation chronique de l'intestin (Aleksandar D. Kostic, Ramnik J. Xavier et Dirk Gevers. 2014) .....	34
Figure 14. Prévalence de l'obésité dans les pays de l'Organisation de coopération et de développement économiques (Matthias Blüher 2019).....	40
Figure 15. Fraction attribuable des nouveaux cas de cancer à a) le diabète b), l'obésité ou c) la combinaison des deux, par pays en l'an 2012 (Pearson-Stuttard J, Zhou B et al. 2018).....	41
Figure 16. Facteurs pouvant influencer la balance énergétique et le développement de l'obésité (Matthias Blüher 2019). .....	43

Figure 17. Relation entre la distribution du score de risque polygénique et celle de l'IMC, du poids et de l'obésité sévère (Amit V. Khera, Mark Chaffin et al. 2019).....	44
Figure 18. Régulation de la prise alimentaire et de la prise de poids par le système nerveux central (Stephan J. Guyenet et Michael W. Schwartz, 2021).....	46
Figure 19. Modèle proposant comment l'augmentation transitoire du LPS circulant après un repas riche en graisse pourrait conduire à une inflammation chronique de bas grade (Amanda J Cox, Nicholas P West, Allan W Cripps, 2015). .....	48
Figure 20. <i>Métabolisme lipidique dans le développement de la stéatose hépatique</i> (C. Postic, J. Girard 2008). .....	50
Figure 21. Interactions entre microbiote, production d'AGCC et pH du colon (à partir des données de la revue de Gijs den Besten et al. 2013).....	52
Figure 22. Fermentation des glucides en acides gras ayant lieu dans le colon (Scott, K. P., Duncan, S. H. and Flint, H. J. (2008), " Dietary fibre and the gut microbiota " , Nutrition Bulletin, 33: 201–211. Copyright (2008) by British Nutrition Foundation). .....	52
Figure 23. Impact du microbiote intestinal sur des organes distants et sa contribution au développement de l'obésité et du syndrome métabolique (Lijuan Sun, et al. 2018). .....	56
Figure 24. Structure et domaines de fonction de quelques peptides antimicrobiens impliqués dans l'homéostasie intestinale. (Jay K. Kolls, Paul B. McCray, Jr, et Yvonne R. Chan, 2008). .....	62
Figure 25. Activation des peptides antimicrobiens à leur sécrétion (Shin JH, Seeley RJ, 2019 et G. Tjabringa, K. Rabe, P. Hiemstra 2005). .....	64
Figure 26. Induction de l'expression de peptides antimicrobiens à la surface d'un épithélium (adapté de Janet Z. Liu, Milad Pezeshki, et Manuela Raffatellu). .....	65
Figure 27. Propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires de la couche de mucus(figure traduite de Aline Dupont et al. 2014). .....	66
Figure 28. Les fonctions multiples des peptides antimicrobiens (Yuping Lai et Richard L.Gallo, 2009)...	69
Figure 29. Hybridation in situ en fluorescence de souris wild-type et Reg3γ-/- avec un marqueur universel bactérien 16S (en vert) (Shipra Vaishnava et al. 2011).....	69
Figure 30. Effets bénéfiques attribués aux probiotiques (S. Parvez et al. 2006). .....	73
Figure 31. Avantages de l'utilisation de <i>L. lactis</i> comme vecteur (à partir de Mohammed Bahey-El-Din, 2010). .....	76
Figure 32. Le système Nisin-Controlled Gene Expression chez la bactérie productrice (Annie Frelet-Barrand, Sylvain Boutigny et al., 2010). .....	78



# **Introduction générale**





# I. L'inflammation de l'intestin et la dysbiose

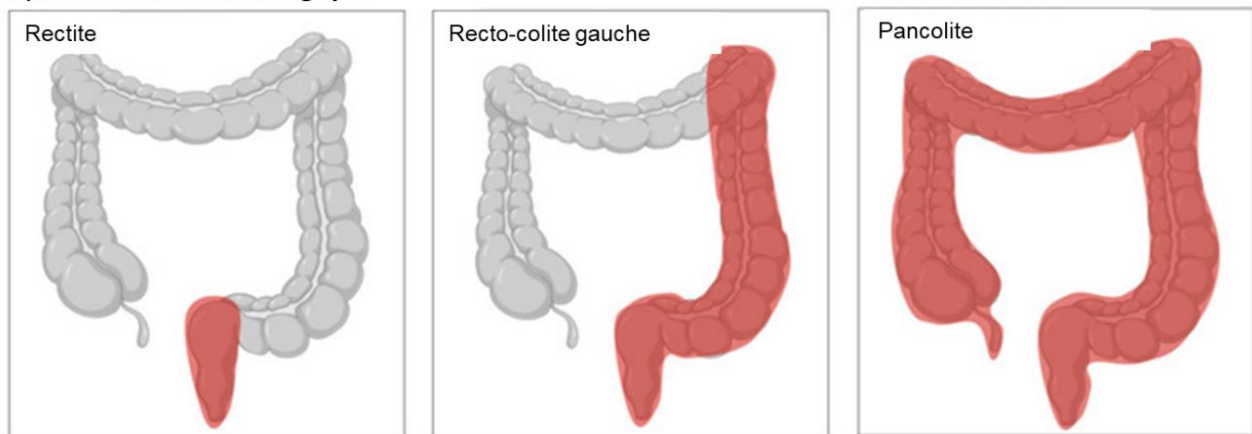
## I.1) Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

### I.1.A) Présentation générale des Maladies inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des troubles complexes du tube digestif qui comprennent principalement deux pathologies : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Elles sont caractérisées par une inflammation partielle du tractus gastro-intestinal. La MC peut toucher tout le tube digestif mais elle concerne le plus souvent le colon ou l'iléon[1,2] tandis que la RCH est localisée au niveau du colon et du rectum[3,4](figure 1).

Les MICI évoluent par phases de poussées et de rémissions dont la durée et la fréquence sont variables en fonction des patients. Pendant les phases de poussées les patients sont sujets à des douleurs abdominales, des diarrhées fréquentes et parfois sanglantes, de la fatigue qui peut être liée à un état de

#### A) Rectocolite hémorragique



#### B) Maladie de Crohn

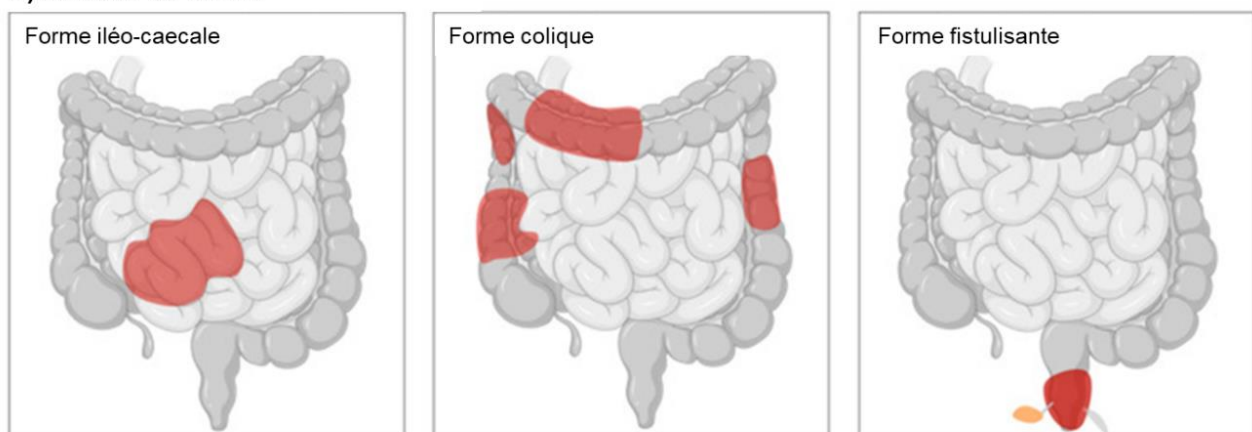


Figure 1. Les différents types de MICI (traduit d'après Karma Yeshe et al. 2020)

dénutrition. Les MICI provoquent une perte importante de la qualité de vie des patients et sont associées à une augmentation du risque de cancer colorectal.

Les antibiotiques et anti-inflammatoires font partie des traitements habituels de ces maladies et permettent d'atténuer les symptômes. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif des MICI.

#### I.1.A.a) Epidémiologie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Actuellement la prévalence de ces maladies est de l'ordre de 1/1000 dans les pays occidentaux où elles sont les plus présentes, c'est-à-dire l'Amérique du Nord, l'Australie, la Nouvelle-Zélande et l'Europe du Nord. Elle apparaît le plus fréquemment dans une population entre 20 et 40 ans et touche davantage les femmes pour la MC et les hommes pour la RCH. Leur incidence est en augmentation à l'échelle mondiale, se stabilisant dans les pays occidentaux mais augmentant dans les pays en voie de développement d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud[5](figure 2). Une gradation nord-sud de la prévalence des MICI a été constatée aux USA et dans plusieurs pays européens[5–8]. Au Canada on observe un gradient est-ouest[9] et en Asie un gradient côte-terres[10,11]. De nombreuses hypothèses environnementales ont été avancées pour expliquer cette distribution géographique. (voir I.1.B.b : Facteurs environnementaux des MICI).

L'incidence des MICI varie en fonction des différentes ethnies et zones géographiques de chaque pays et semble, d'après plusieurs études d'Afrique du Sud et des Etats-Unis, affecter principalement les populations caucasiennes. Cependant les causes de cette répartition restent sujettes à controverse. En effet l'incidence des MICI dans les populations noires Américaines semble avoir été sous-évaluée par le manque d'accès aux soins[12].

Au Royaume-Uni, les populations immigrées sud-asiatiques ont un risque plus élevé de contracter la RCH. Il a été également rapporté que les populations juives migrantes ont un taux plus élevé de MICI que la population générale de leurs pays d'accueil tandis qu'en Israël on constate une hétérogénéité de l'incidence des MICI entre les ashkénazes et les séfarades. Ceci porte à croire que des prédispositions génétiques rendent certaines populations plus sujettes aux MICI[12].

Les différents marqueurs de risques génétiques et environnementaux associés aux MICI sont développés dans la partie I.1.B.

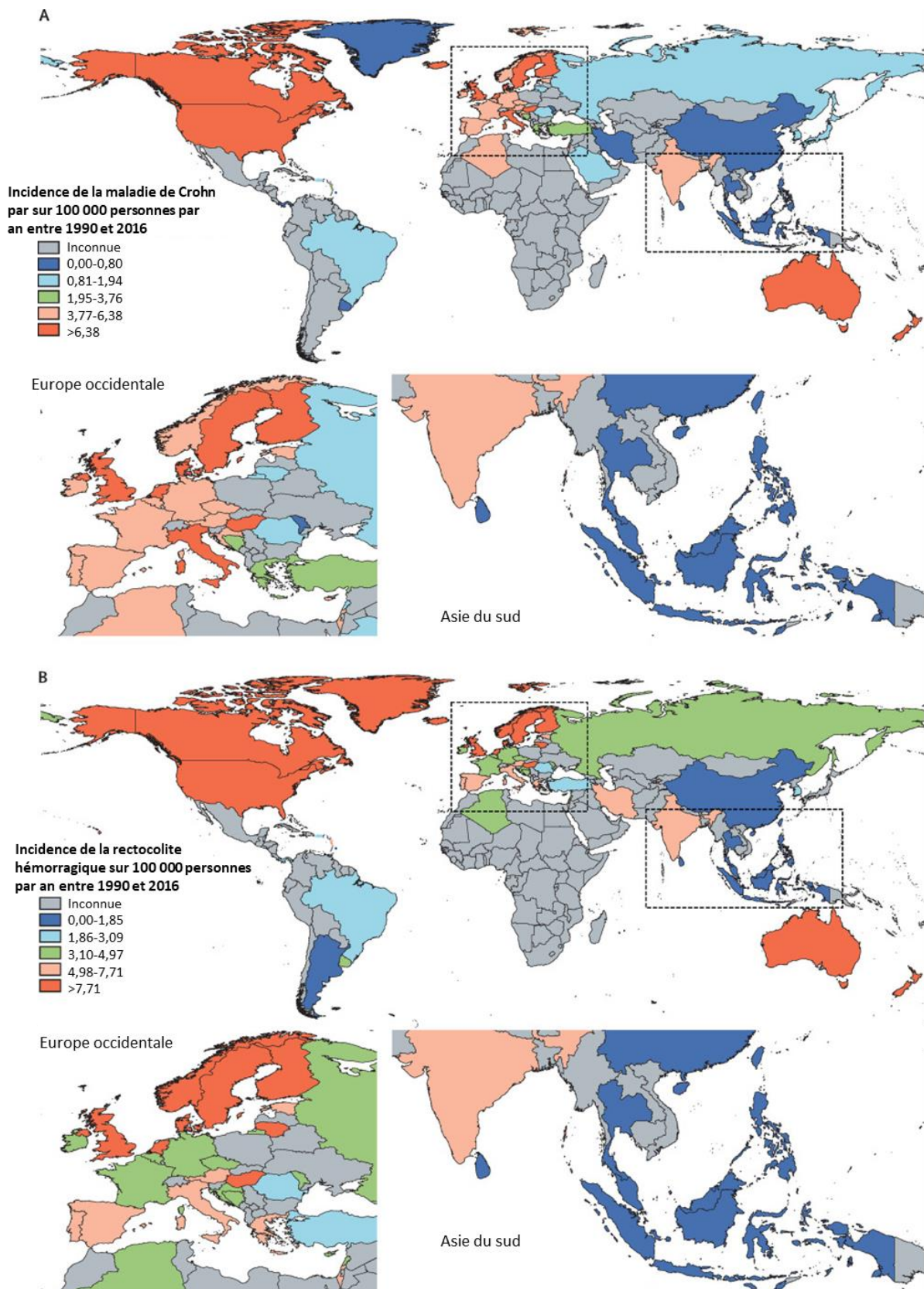


Figure 2. Incidence de la MC et de la RCH dans le monde (S. Ng, H. Shi, N. Hamidi et al. 2017)

### I.1.A.b) Diagnostic et prise en charge des MICI

Les MICI sont généralement diagnostiquées en période de poussée inflammatoire pendant lesquelles vont se manifester les symptômes cliniques courants : douleurs abdominales, nausées, diarrhées (souvent sanglantes), fatigue, fièvre, amaigrissement. Des manifestations rhumatologiques, dermatologiques, oculaires, hépatiques ou hématologiques (carences en fer, vitamines et inflammation) peuvent également aiguiller le diagnostic.

L'identification d'une MICI est difficile et se fait généralement après avoir écarté les autres causes potentielles des symptômes intestinaux (infections, médicaments, syndrome de l'intestin irritable, maladie cœliaque, etc.).

Globalement les symptômes de la MC et de la RCH sont partagés et il est nécessaire de faire appel à l'avis d'un spécialiste pour établir le diagnostic. Des examens endoscopiques avec biopsies permettent d'identifier la zone, l'intensité et l'étendue des lésions intestinales et de discriminer entre la MC et la RCH.

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif des MICI cependant des traitements médicamenteux et une adaptation de l'alimentation et du mode de vie permettent d'alléger en partie les symptômes et améliorer la qualité de vie des patients[1,4].

Parmi les spécialités thérapeutiques utilisées comme traitements suspensifs des MICI on retrouve à titre d'exemple [12]:

- L'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) : mélasazine, sulfasalazine, olsalazine (voie orale ou rectale). Ils sont prescrits pour des poussées faibles et en prévention de rechute suite à une intervention chirurgicale. Ils se lient au récepteur PPAR $\gamma$ , réduisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires et inhibent IL-1, IL-2 et TNF $\alpha$ .
- Les corticoïdes : prednisone et prednisolone puis Synacthène® à l'arrêt du traitement. Budésonide pour formes iléo-coliques droites de la MC. Ils sont prescrits pour les poussées moyennes à sévères. Ils se lient aux récepteurs GR et modulent la réponse inflammatoire : inhibition des cytokines pro-inflammatoires, de la phospholipase A2 (libération de l'acide arachidonique), de la production d'espèces réactives de l'oxygène, modulation de la neuroinflammation.
- Les antibiotiques (en cas d'aggravation ou infection soudaine après avis du spécialiste).
- Les immunomodulateurs : Azathioprine (MC et RCH), Ciclosporine (RCH), 6-MP (MC et RCH), Méthotrexate (MC). Indiqués comme traitements de fond des formes sévères de MICI ainsi que

dans les formes cortico-dépendantes et cortico-résistantes. Ils agissent généralement en réduisant la prolifération des cellules inflammatoires.

- Les anti-TNF comme l'infliximab (MC et RCH) et l'adalimumab (MC). Indiquées en traitement d'attaque, suivi par des perfusions d'entretien, dans les poussées modérées à sévères chez les patients non-répondants à la corticothérapie et aux immunomodulateurs. Les effets secondaires peuvent survenir suite à 5% des perfusions et sont parfois grave, pouvant conduire au décès des patients. Les perfusions à répétition favorisent la survenue d'un lupus dans 10% des cas et augmentent les risques infectieux. Pour les limiter, leur prise est conditionnée d'une prise préventive de corticoïdes et anti-histaminiques.

Le probiotique *E. Coli* Nissle 1917 peut également être proposé en complément pour le traitement de la RCH. L'ablation d'une partie des lésions inflammatoires peut être proposée aux patients qui résistent aux traitements médicaux. La chirurgie peut également être imposée en cas d'urgence médicale pour complications graves impliquant le pronostic vital des patients.

La consommation de tabac a un rôle aggravant de la MC et doit donc être arrêtée. En dehors d'un régime varié et équilibré, la Haute Autorité de Santé (HAS) ne donne pas de recommandations diététiques particulières pour les patients atteints de MICI. Pendant les poussées inflammatoires marquées, un régime d'épargne intestinale (apport restreint en fruits et légumes) peut être temporairement préconisé[1,4]. L'alimentation a un rôle crucial dans la santé intestinale et il est important pour les patients de consulter un diététicien pour repérer les erreurs et les pièges alimentaires dans lesquels ils peuvent tomber, notamment influencés par les modes alimentaires[13].

Certains patients atteints de MC peuvent avoir des problèmes de malabsorption des nutriments, auquel cas des compléments alimentaires par voie orale, ou par intraveineuse pour des carences majeures, peuvent être préconisés. En période de poussée inflammatoire la nutrition entérale exclusive (NEE) est efficace pour le traitement de la MC notamment en cas de dénutrition avancée. La NEE est plus courante chez les enfants en raison de leurs besoins spécifiques en nutrition et des effets délétères des corticoïdes sur leur croissance[14]. D'autant plus que la NEE se montre plus efficace que les corticoïdes pour réduire l'indice d'activité de la maladie en pédiatrie[15]. Son utilité est en revanche plus limitée chez l'adulte[16].

Les MICI sont des maladies multifactorielles dont le développement et le pronostic sont influencés par des facteurs génétiques et environnementaux. De nombreuses pistes de recherche sont explorées afin de mieux prédire le type de MICI développé et la réponse des patients aux différents traitements, mettre en place des mesures pour améliorer le quotidien et réduire les risques de mortalité.

## I.1.B) Facteurs de risques des MICI

### I.1.B.a) Facteurs de risques génétiques

Les premières études génétiques de la MC ont montré l'implication du gène NOD2[17], qui code pour un récepteur de molécules de la paroi bactérienne et reste à ce jour le facteur de risque génétique le plus fort et spécifique de la MC. Au fil des ans les études d'association pangénomique (en anglais genome-wide association study, GWAS) ont permis d'identifier plus de 240 loci associés au risque de développer une MICI[18]. Les allèles impliqués dans ces pathologies sont de fréquence différente entre les différentes ethnies mais restent partagés par toutes[19]. Environ 30% des loci impliqués dans la MC et la RCH sont partagés, ces maladies ayant de nombreux mécanismes communs.

De nombreux gènes impliqués touchent des voies cruciales dans l'homéostasie intestinale telles que les fonctions de barrière intestinale, la réparation des tissus, la défense contre les pathogènes, la régulation des systèmes immunitaires inné et adaptatif, les espèces réactives de l'oxygène, l'autophagie, la mort cellulaire, le stress du réticulum endoplasmique ou l'homéostasie intracellulaire[20](figure 3).

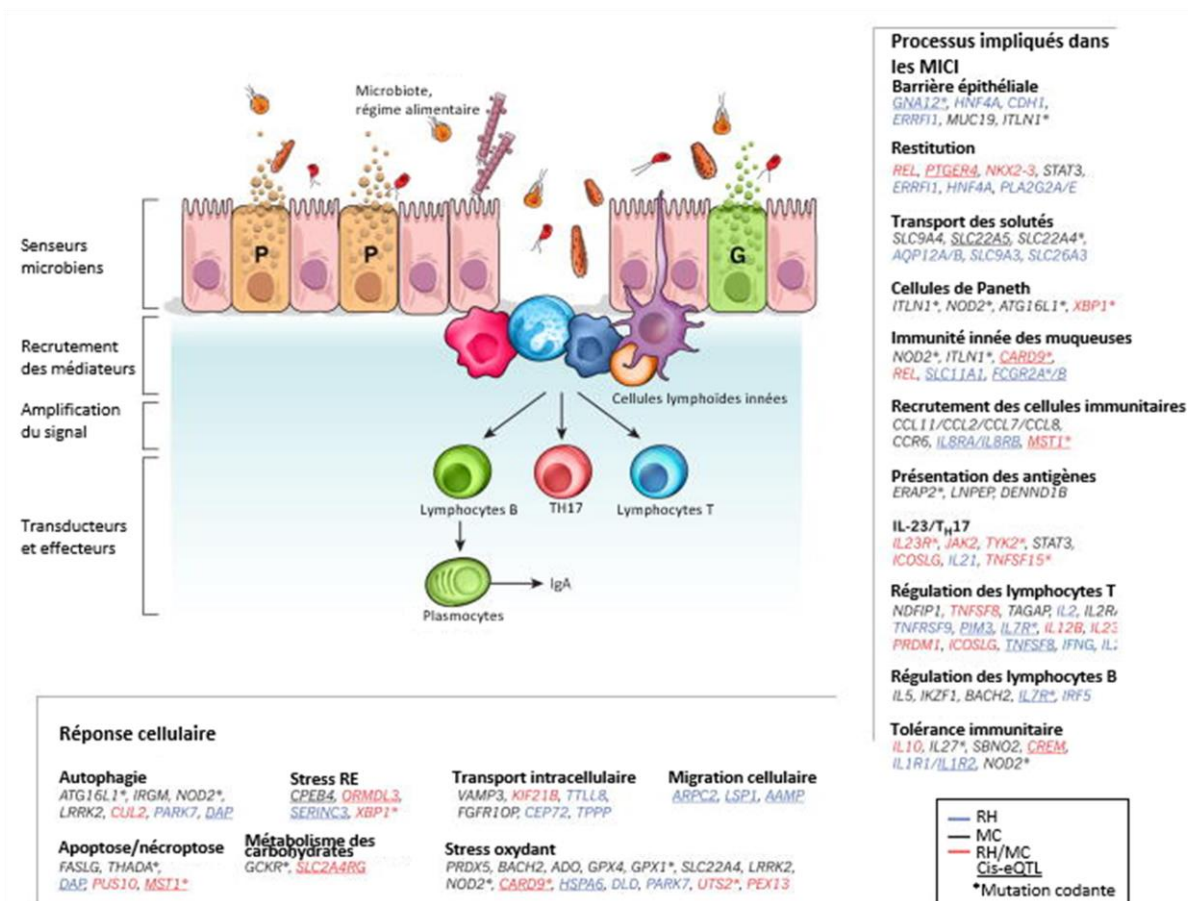


Figure 3. Différents marqueurs génétiques impliqués dans les MICI (traduit d'après Bernard Khor, Agnès Gardet and Ramnik J. Xavier., 2011)

Cependant les variations génétiques actuellement identifiées n'ont qu'un faible impact sur le risque de développer une MICI -entre 13 et 13.5% pour la MC et entre 7.5 et 9% pour la RCH[21]- et ne sont pour la plupart pas significativement associées à des formes cliniques spécifiques chez les patients à quelques exceptions près comme NOD2, MHC, et MST1 qui sont associées à différentes localisations de la maladie[22]. Compte tenu du nombre important de loci associés, qui continuera de croître à l'avenir et dont la majorité n'a qu'un impact faible pris individuellement, le dépistage génétique restera probablement peu pertinent pour les patients dans la majorité des cas[23–25].

Actuellement les généticiens recherchent plutôt des marqueurs génétiques fortement associés à des formes rares de la maladie. Des mutations des gènes XIAP[26–29], IL-10 et IL-10R[30,31] par exemple sont fortement associés à des développements précoces de MICI pédiatriques.

#### I.1.B.b) Facteurs de risques environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux liés au mode de vie moderne sont liés au développement des MICI[32,33](figure 4). Les facteurs de risque les mieux connus sont la consommation de tabac, qui est un facteur de risque de la MC mais est protectrice contre la RCH, et l'appendicectomie qui réduit le risque de développer la RCH de 70% lorsqu'elle a lieu avant 20 ans mais augmente le risque de MC[34,35]. La prise de médicaments contraceptifs, d'hormones ou d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens est lié à une augmentation du risque de développer une MICI[36–38].

L'alimentation joue également un rôle important dans le développement de la maladie. Une alimentation riche en fruits, légumes et en source d'oméga-3 aurait des effets protecteurs contre la MC[39] tandis que les acides gras insaturés trans[40] (retrouvés dans les produits animaux et les produits transformés) et les boissons sucrées[41] sont associés à une augmentation du risque de développer la RCH. Quelques études expérimentales montrent un lien potentiel entre l'exacerbation des symptômes des MICI et la présence d'additifs alimentaires dans la nourriture mais peu d'études épidémiologiques ont été faites à ce sujet[42]. Chez le nourrisson, l'allaitement a un effet protecteur contre le développement des MICI[43].

Certaines études suggèrent que le manque d'exposition au Soleil, et la carence en vitamine D qui en résulte, serait un facteur de risque dans le développement de la MC[44–46]. L'observation d'un gradient nord-sud de la distribution des MICI semble aller dans le sens de cette hypothèse[5–8]. De nombreuses études montrent l'importance de la vitamine D dans la réponse immunitaire[47–52]. D'après une méta-analyse de 2015, les patients atteints de MICI ont 64% de chances en plus que la population générale d'être carencés en vitamine D[53].



Il semblerait que la vie en milieu urbain en général est associée au risque de développement d'une MICI dans plusieurs types de population[41,54]. La pollution de l'air au dioxyde d'azote serait un facteur de risque dans le développement de la MC notamment chez les personnes jeunes[55–57]. Parmi les facteurs de risques surprenants on retrouve le niveau d'éducation, un niveau socio-économique élevé, la couverture vaccinale et la baisse d'exposition aux infections ce qui a conduit à l'hypothèse hygiéniste du développement des MICI. Cependant les différentes études à ce sujet donnent des résultats contradictoires ou difficiles d'interprétation[58]. A noter que certains facteurs de risques liés à l'hygiène de vie semblent différer entre les différentes ethnies. Le fait d'être fumeur par exemple est un facteur de risque bien connu chez les populations occidentales[59] mais ne l'est pas chez les populations asiatiques[60] ou juives israéliennes[61]. Une étude de population australienne a montré que l'utilisation d'antibiotiques est liée à une baisse du risque de MC chez les immigrants du Moyen-Orient alors qu'elle est liée à une augmentation du risque dans la population Caucasienne[62]. De fait l'augmentation du risque de développer une MICI à cause de traitements antibiotiques chez les populations occidentales a été observée à de nombreuses reprises comme en témoigne une méta-analyse de 11 études ayant eu lieu dans des pays industrialisés d'Europe et Amérique du Nord[63]. Toujours en Australie, la localisation en zone rurale, la possession d'animaux de compagnie et l'exposition à des animaux d'élevage, réduit significativement les risques de MC et de RCH dans les populations immigrées mais pas dans la population Caucasienne[62]. Au contraire, une étude sur des enfants canadiens semble lier la possession d'animaux de compagnie à une augmentation du risque de développer la MC[64].

En somme les facteurs environnementaux pouvant potentiellement conduire au développement d'une MICI sont : 1) une alimentation grasse et pauvre en fibres, 2) le tabagisme (pour la MC) et l'exposition aux polluants atmosphériques, 3) un affaiblissement du système immunitaire en raison d'une carence en vitamine D lié au manque d'exposition au Soleil 4), une rupture de l'équilibre microbien suite à une antibiothérapie et 5) un manque d'exposition aux infections et composantes microbiennes notamment durant la petite enfance (hypothèse hygiéniste).

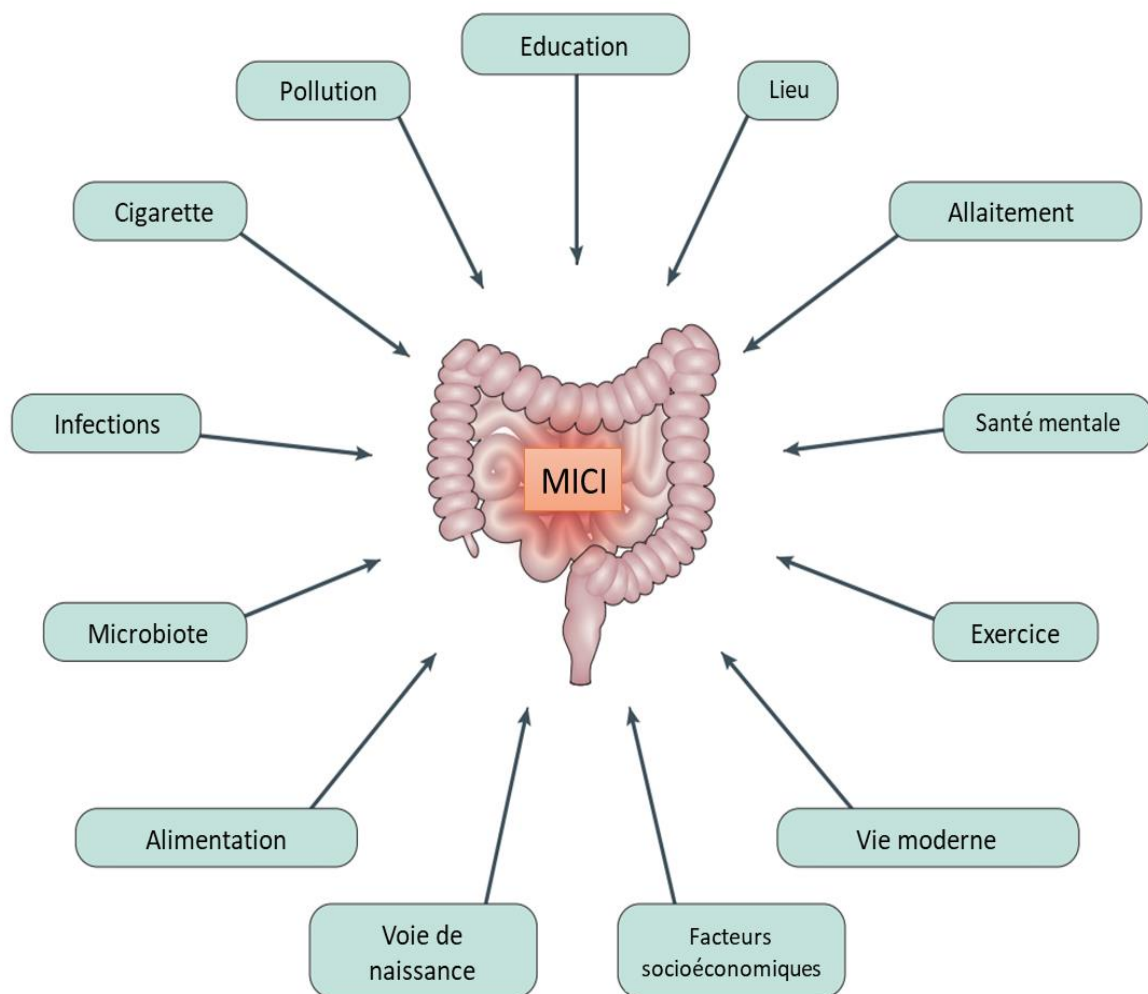


Figure 4. Les facteurs de risques environnementaux contribuant au développement des MICI (adapté de Ashwin N. Ananthakrishnan et al. 2017)

## I.1.C) Physiopathologie des MICI

### I.1.C.a) La perméabilité de la barrière intestinale

Chez les personnes atteintes de MICI on retrouve de nombreuses atteintes à la barrière intestinale la rendant plus perméable. Le mucus, produit par les cellules en gobelet, est une barrière physique importante contre les pathogènes et contient également des peptides antimicrobiens (PAMs) produits par les cellules de Paneth protégeant l'individu contre les pathogènes (voir partie III).

La mesure de la perméabilité intestinale est utilisée en médecine clinique pour identifier les patients à haut risque de rechute[65]. Les cytokines pro-inflammatoires telles que  $IFN\gamma$  et  $TNF\alpha$  contribuent à la dérégulation de la barrière intestinale. Ainsi, l'administration d'anti- $TNF\alpha$  est utilisée dans le traitement des MICI sévères pour lesquelles les traitements de fond ne sont pas efficaces et permettent une restauration de la barrière épithéliale[66]. La perméabilisation de l'intestin est la cause des symptômes et de l'aggravation de l'état des patients et les traitements doivent la prévenir en priorité.

Chez l'individu sain le mucus est composé de deux couches : 1) la couche interne qui est compacte, statique et dénuée de bactéries ; 2) la couche externe qui est lâche, suit les mouvements péristaltiques, et est une niche écologique riche d'une communauté microbienne complexe dont la présence rend difficile la pénétration par des agents infectieux. Chez les patients atteints de MICI la couche de mucus diminue en épaisseur et en viscosité et sa composition en oligosaccharides est altérée[67]. Les souris KO pour le gène *Muc2* développent spontanément une colite puis éventuellement le cancer

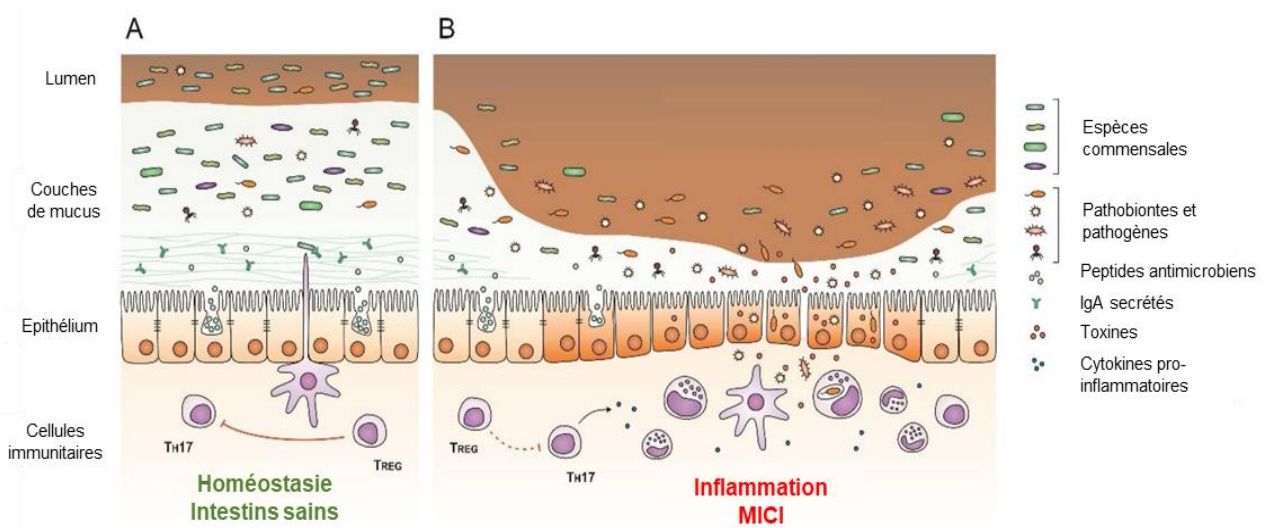


Figure 5. Schéma de la muqueuse intestinale chez A) le patient sain et B) le patient atteint d'une MICI (traduit d'après Mario Matijašić et al. 2020). Chez la personne saine le mucus est en deux couches. Chez l'individu malade la couche de mucus est amoindrie et la barrière intestinale lâche, permettant aux antigènes bactériens de pénétrer la barrière et provoquer l'inflammation des tissus.

colorectal[68,69]. Chez ces animaux, les bactéries intestinales sont en contact direct avec l'épithélium[70], y compris au fond des cryptes de Lieberkühn dont la morphologie est altérée par rapport aux souris sauvages (figure 5).

Les protéines des jonctions serrées, qui ont pour fonction de limiter les flux paracellulaires, ont-elles aussi une expression perturbée chez les patients atteints de MICI. L'occludine, JAM-A et les claudines 3, 5 et 8 sont fortement diminuées chez les patients atteints de la MC tandis que la claudine 2, une protéine porogène, est fortement augmentée[71,72]. Chez les patients atteints de RCH on constate une baisse de l'expression de l'occludine, JAM-A, des claudines 1 et 4, et également une augmentation de l'expression de la claudine 2[72]. Certains proches de ces patients ont également une perméabilité intestinale augmentée malgré l'absence de symptômes[73–75].

#### I.1.C.b) L'inflammation : acteur clé de la pathologie

La perte de fonction de la barrière intestinale conduit à une sur-activation du système immunitaire en raison de la translocation d'agents bactériens à travers la *lamina propria* de l'intestin. Plusieurs ligands associés à des pathogènes dits PAMPs (pathogens-associated molecular patterns) mais aussi des ligands associés au stress et à la mort cellulaire dits DAMPs (danger-associated molecular patterns) vont être reconnus par divers Pattern Recognition Receptors (PRRs) comme par exemple les récepteurs Toll-Like (TLR), situés à la surface des cellules épithéliales de l'intestin, des macrophages et des neutrophiles, notamment le TLR-4 qui va reconnaître le LPS de la paroi des bactéries gram négatives ainsi que des DAMPs comme la  $\beta$ -défensine, la fibronectine, ou les héparanes sulfates[76]. Les TLR-1, TLR-2 et TLR-6 reconnaissent le peptidoglycane (PGN) et le TLR-5 reconnaît la flagelline (constituant de la flagelle bactérienne)[77]. Certains ligands comme l'acide gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelique (constituant des parois des bactéries gram négatives) ou le muramyl-dipeptide (constituant du PGN de la paroi bactérienne) peuvent pénétrer dans la cellule où ils sont reconnus par les récepteurs NOD1 et NOD2.

Ces différents récepteurs, une fois stimulés, entraînent des cascades de réaction résultant en l'activation entre autres de la caspase-1 (impliquée dans l'inflammasome) ou de la voie NF- $\kappa$ B et entraînent la sécrétion de chémokines et de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ou IL-8 (figure 6)[78].

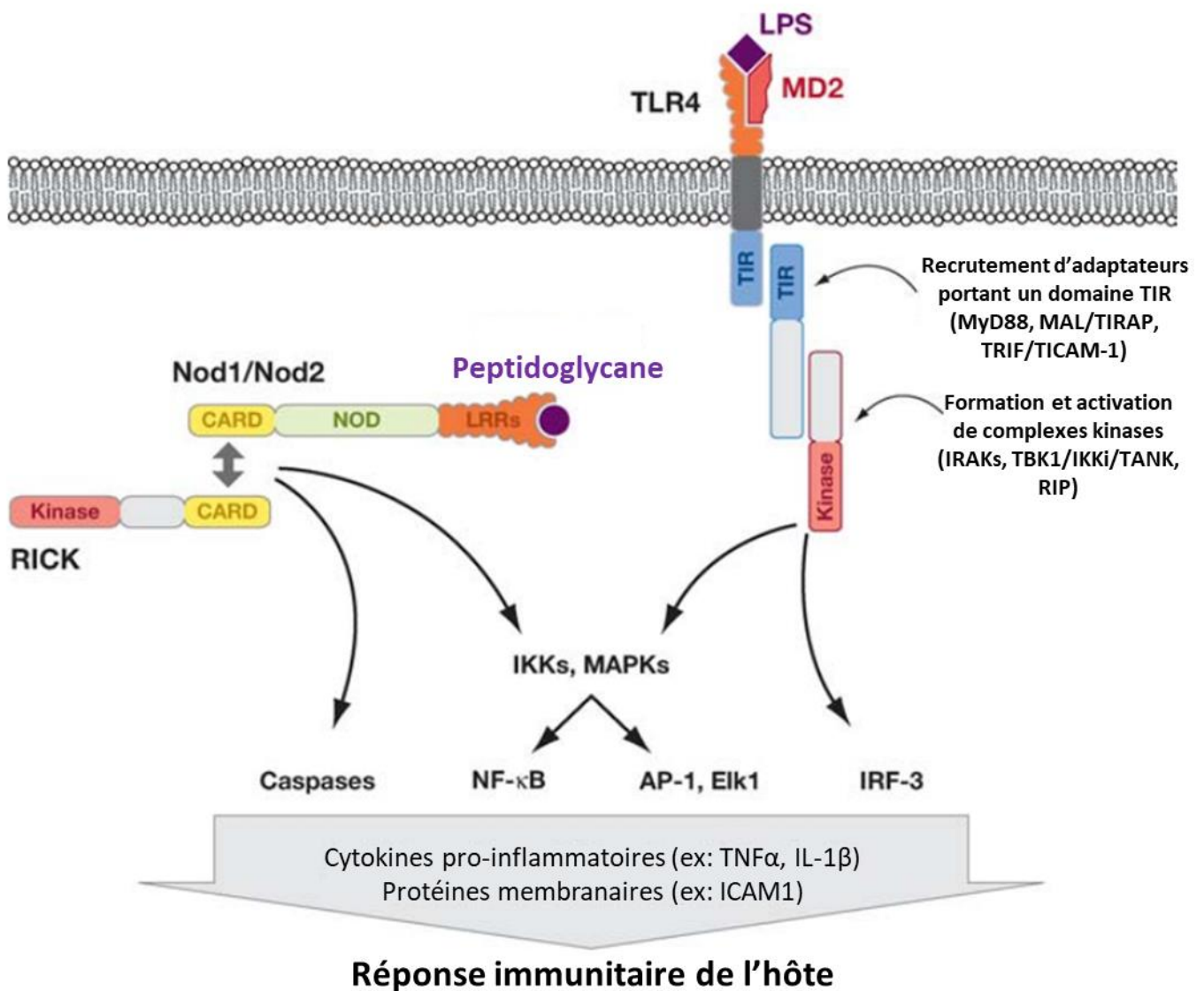


Figure 6. Schématisation de l'activation des voies de signalisation de Nod1, Nod2 et TLR4 (traduit d'après Naohiro Inohara, Mathias Chamaillard et al. 2005). Nod1 et Nod2 reconnaissent des antigènes dérivés de peptidoglycane bactériens (PGN) ce qui entraîne le recrutement d'une protéine kinase (RICK) par les interactions CARD/CARD. Une fois RICK recrutée, Nod1 et Nod2 activent des facteurs de transcription (NF-κB, AP-1, and Elk-1) et les caspases. Le LPS se lie au TLR4 après sa fixation à son corécepteur, le MD2, ce qui entraîne le recrutement de plusieurs protéines en aval, notamment des adaptateurs à domaine TIR (e.g., MyD88, MAL/TIRAP, TRIF/TICAM-1) qui vont eux-mêmes entraîner la formation et l'activation de plusieurs complexes à kinase (IRAKs, TBK1/IKKi/TANK et RIP) qui vont phosphoryler IKKs, MAPKs, et IRF-3. Cela entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires et de protéines de surface des cellules T comme ICAM-1.

En temps normal les lymphocytes T de la *lamina propria* n'ont pas de réponse immunitaire contre les bactéries commensales en raison de la production d'IL-10 et TGF- $\beta$  par les cellules dendritiques des ganglions mésentériques, favorisant les lymphocytes Treg qui sont impliqués dans la tolérance immunitaire[79]. Cependant la perméabilisation de la barrière augmente grandement l'exposition des récepteurs aux antigènes commensaux et exacerbe les phénomènes pro-inflammatoires.

Ainsi, sous l'action des cytokines inflammatoires, les lymphocytes T CD4+ naïfs vont se différencier en lymphocytes T effecteurs, principalement Th1 et Th17 dans la MC[80], qui vont infiltrer la muqueuse des patients et amorcer une inflammation locale persistante. Celles-ci vont à leur tour sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ou la famille IL-17. D'autres cytokines, ayant une fonction qui peut être pro ou anti-inflammatoire selon les circonstances, vont être sécrétées. Notamment IL-22[80,81] (figure 7), une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'activation de STAT3 qui est

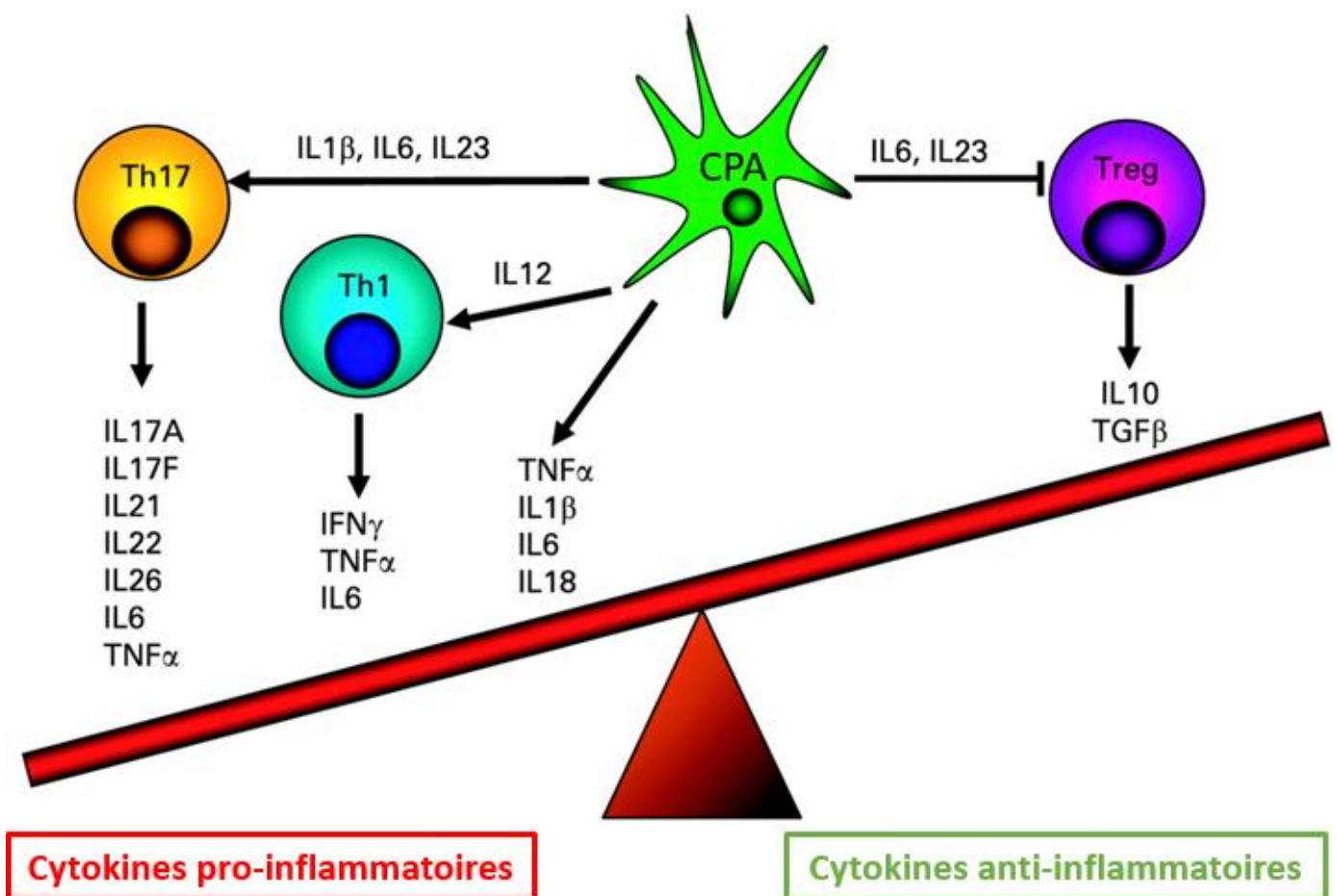


Figure 7. Déséquilibre des cytokines pro et anti-inflammatoires chez les patients atteints de MC (traduit d'après S. Brand, 2009). Le contact des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) avec des ligands bactériens induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th1 et Th17.

augmentée chez les patients atteints de MICI et a un rôle protecteur dans l'inflammation de la muqueuse intestinale en promouvant la réparation des tissus, la production de mucus et la production de peptides anti-microbiens notamment de la famille REG3[82]. De plus le défaut de lymphocytes Treg abolit la tolérance aux bactéries commensales.

Les patients atteints de RCH ont une muqueuse principalement infiltrée par des lymphocytes Th2 atypiques comme en témoigne l'augmentation de la production d'IL-5 et IL-13[83,84]. Le rôle d'IL-4, une cytokine critique dans la différenciation des Th2, reste controversé notamment car elle n'est pas systématiquement augmentée de façon significative dans les biopsies des patients[83]. Il semblerait donc que la production d'IL-5 et d'IL-13 chez les patients de la RCH soit principalement due aux cellules natural killer (NK) [81,85](figure 8).

Les patients atteints de MICI ont un risque surélevé de développer le cancer colorectal (CRC). En effet on estime qu'environ 15% des patients atteints de MICI en meurent et le risque de développer le CRC augmentent de 0.5 à 1% par an à partir de 8 à 10 ans après le diagnostic de la maladie et est plus élevé chez les patients atteints de pancolite[86,87](figure 9).

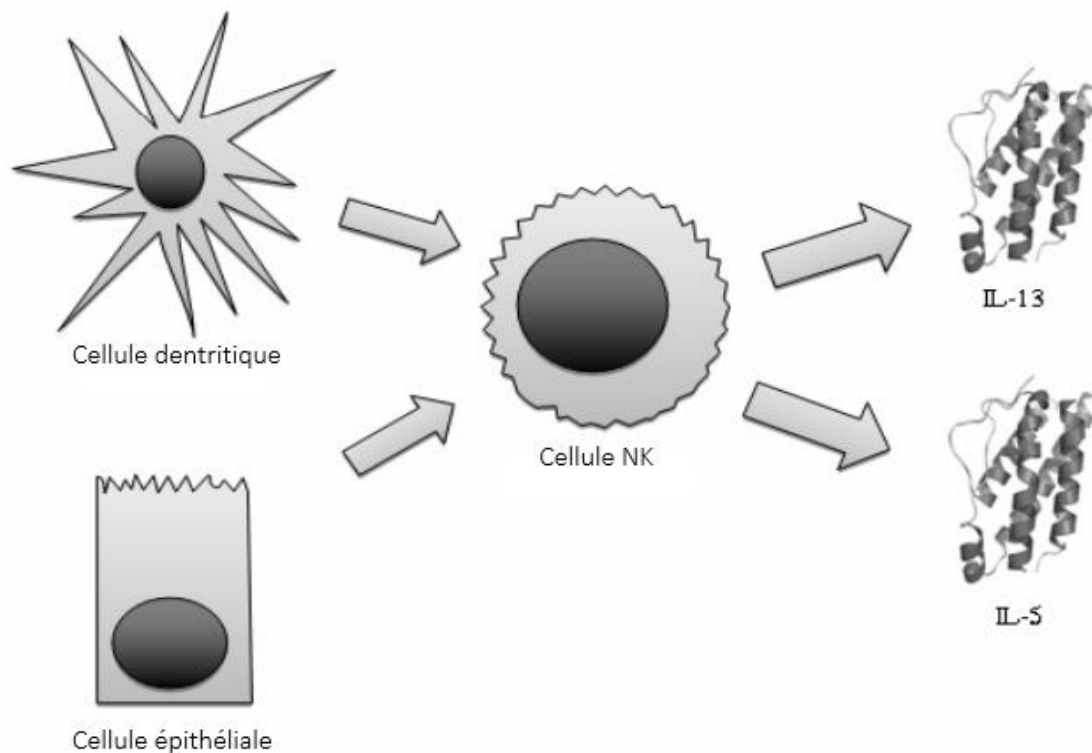


Figure 8. Réponse immunitaire Th2 atypique chez les patients atteints de RCH (traduit d'après Moldoveanu, Al C.Diculescu, M., Fierbinteanu Braticevici, C., 2015).

IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la carcinogénèse de nombreux tissus dont l'épithélium intestinal via la voie IL-6/JAK/STAT3. L'expression de cette voie métabolique est augmentée chez les patients atteints de MICI, que ce soit en phase active ou inactive de la maladie. De plus l'activation de cette voie est proportionnelle à la gravité de la MICI[88]. En effet la voie IL-6/STAT3 est impliquée dans la réparation des tissus et la prolifération cellulaire et entre donc également en jeu dans la prolifération des cellules tumorales. On retrouve d'autres cytokines induisant la réparation des tissus impliquées dans le développement du CRC comme IL-22 et IL-27 (figure 10)[85].

En résumé, chez les patients atteints de MICI, la perte de fonction de la barrière intestinale et le contact direct entre les bactéries commensales et les cellules de l'épithélium encourage la suractivation du système immunitaire. Les cytokines pro-inflammatoires telles IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  ont un effet cytotoxique, entraînant l'apparition de dommages tissulaires et l'activation des voies de réparation des tissus. Une perte de contrôle de ces mécanismes peut à terme entraîner le développement du cancer colorectal. Un des acteurs clés dans l'initiation et le maintien de ces phénomènes pro-inflammatoires est le microbiote intestinal.

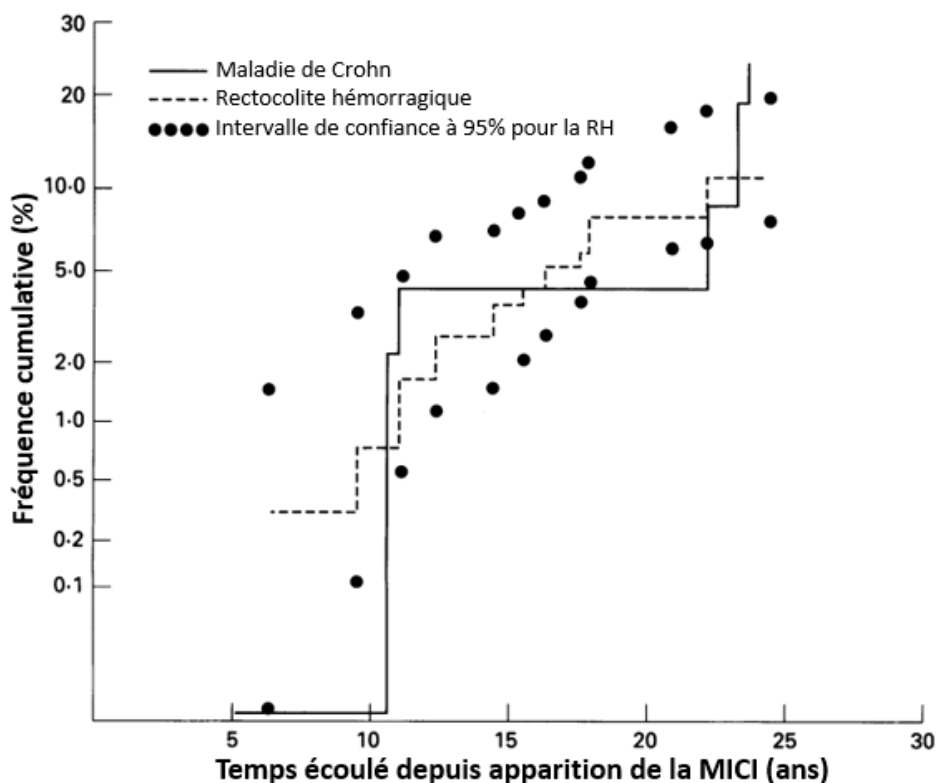


Figure 9. Risque de développer le cancer colorectal entre 5 et 30 ans après le diagnostic d'une MICI (traduit d'après C D Gillen, R S Walmsley et al. 1994).



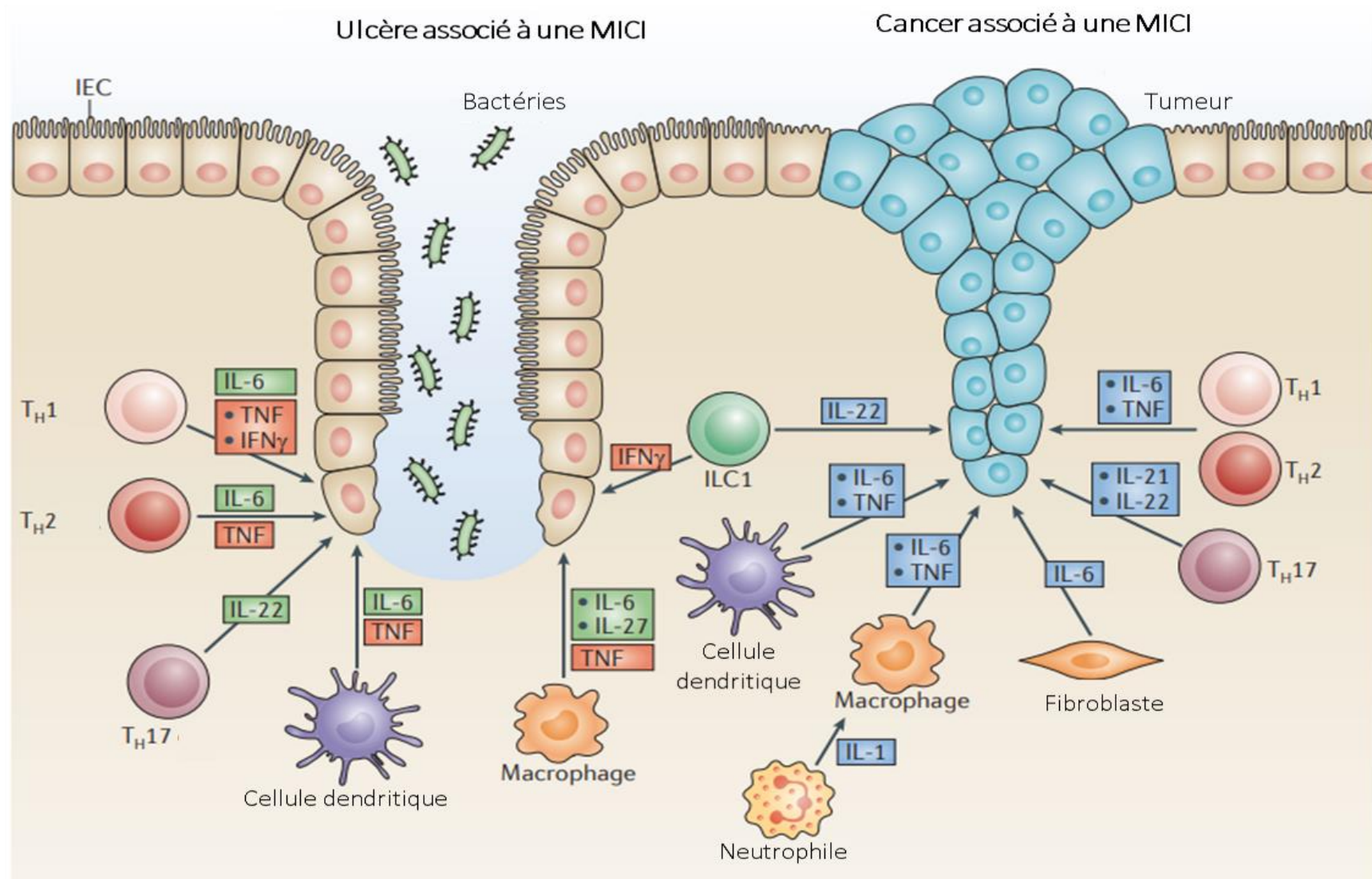


Figure 10. Rôle des cytokines de l'épithélium intestinal dans la guérison des tissus et le développement du cancer colorectal (Markus F. Neurah, 2014). En vert sont représentés les cytokines ayant un effet bénéfique sur la réparation des tissus, en rouges ceux ayant un effet cytotoxique, en bleu sont représentés les facteurs impliqués dans la carcinogénèse.

## I.1.D) Le rôle du microbiote intestinal dans les MICI

### I.1.D.a) Définition et fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est l'écosystème de microorganismes –principalement des bactéries mais aussi des archées, levures, virus ou protozoaires[89]- vivants dans nos intestins. Sa composition en espèce est très variée entre les individus et le long du tractus gastro-intestinal mais certaines familles sont globalement partagées. L'abondance en bactéries du microbiote suit un gradient de la partie proximale à la partie distale du tube digestif en fonction des conditions environnementales de chaque zone (figure 11).

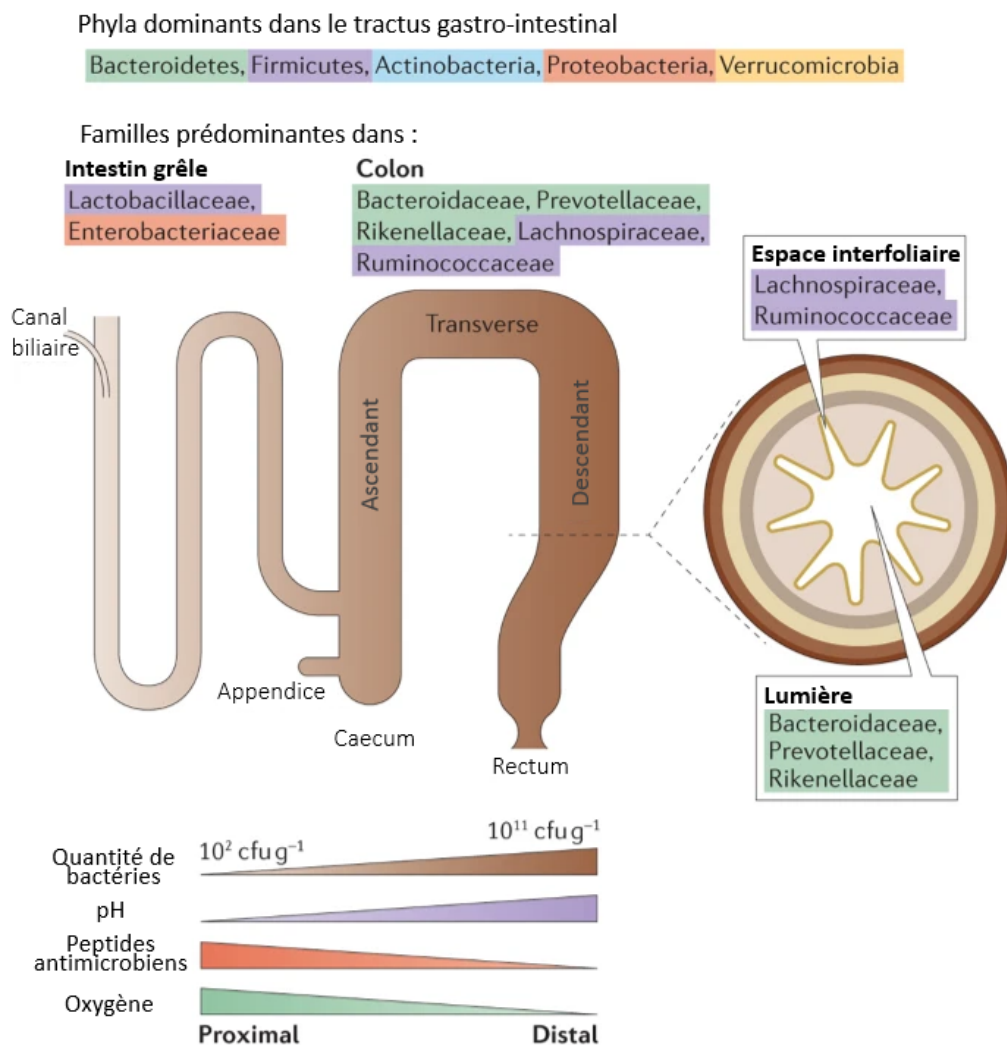


Figure 11. La composition du microbiote intestinal en fonction de l'emplacement dans le tube digestif. La quantité de bactéries du microbiote intestinal varie notamment en fonction de la concentration en oxygène, en peptides antimicrobiens et en fonction du pH (G.P. Donaldson, S. Melanie Lee & S.K. Mazmanian, 2015).

On estime qu'il existe environ 1800 genres pour 15000 à 36000 espèces bactériennes dans le microbiote intestinal[90]. Il y aurait autant de bactéries dans le microbiote intestinal que de cellules humaines dans le corps[91]. Le microbiote intestinal exprimerait également 100 fois plus de gènes que son hôte humain[92]. Il a des fonctions majeures dans le corps humain, notamment dans la digestion des polysaccharides, la synthèse d'acides aminés essentiels et de vitamines[93]. Il joue un rôle majeur dans la protection contre les organismes pathogènes qui s'aventureraient au niveau de la barrière intestinale. Il régule la production de mucus, de peptides antimicrobiens et peut métaboliser certaines toxines, d'origine environnementale ou microbienne, dangereuses pour son hôte[94,95]. Mais il a également un rôle plus direct dans le développement du système immunitaire inné et adaptatif de l'hôte. En effet, les animaux axéniques (élevés dans des conditions stériles et ne possédant pas de microbiote intestinal) sont atteints de déficits immunitaires se traduisant par une réduction de la taille des ganglions mésentériques, une réduction en lymphocytes Th17 et Treg et une réduction de la réponse immunitaire face à des agents infectieux comme *Shigella* et *Listeria*[96].

Enfin il joue un rôle dans le développement neuronal et cognitif via l'axe intestin-cerveau[97]. Les animaux axéniques ont une réponse au stress exagérée par rapport aux animaux élevés en conditions normales qui est réversible chez ceux ayant subi un transfert de flore peu après la naissance mais pas chez ceux qui ont reçu cette flore à un âge avancé[98]. Des souris axéniques ayant reçu la flore de nourrissons prématurés ayant un retard de croissance ont une réduction de marqueurs des neurones et leur myélinisation par rapport à celles ayant reçu un microbiote de nourrisson prématuré sans retard de croissance[99].

Les nombreuses fonctions du microbiote intestinal le font qualifier d'organe par une partie du corps médical. Lorsque l'équilibre hôte-microbiote est rompu et que celui-ci entre en dysbiose, c'est-à-dire un déséquilibre de la biodiversité se caractérisant généralement par une baisse de la diversité et une augmentation des bactéries pathogènes au détriment des bactéries bénéfiques, cela se traduit par une perte de fonction métabolique et immunitaire et l'apparition de troubles intestinaux.

#### I.1.D.b) Etablissement et composition du microbiote intestinal sain

Le microbiote intestinal commence à s'établir à la naissance pendant laquelle le tractus gastro-intestinal du nourrisson est colonisé par la flore vaginale de la mère, pour les enfants nés par voie basse, ou par la flore de la peau et de l'environnement alentour, pour les enfants nés par césarienne, avec des conséquences sur la composition du microbiote et la santé de l'enfant à long terme. Les enfants nés par voie basse ont une plus grande proportion de *Bifidobacterium* et *Bacteroides* tandis que le microbiote des enfants nés par césarienne présentent davantage de bactéries pathogènes opportunistes[100–102].

Sa composition se stabilise entre 2 et 4 ans[103]. Elle peut évoluer le long de la vie d'un individu en fonction de son alimentation, de son historique médical et pendant son vieillissement.

On reconnaît généralement l'existence de trois entérotypes distincts et indépendants de l'âge, du genre, du lieu de vie et de la culture. Ces entérotypes commencent à s'établir entre 9 et 36 mois chez l'enfant et sont définis par la distribution d'un taxon particulier. Un entérotipe est dominé par *Bacteroides*, le deuxième présente davantage de *Prevotella* (dont l'abondance est inversement proportionnelle aux *Bacteroides*) et le dernier se caractérise par une sur-représentation des *Firmicutes*, notamment du genre *Ruminococcus*. Cependant la distribution de ces entérotypes dans la population n'est pas discrète et le nombre d'entérotypes identifiés varie entre deux et quatre (voire à un gradient) d'étude à étude (figure 12). Certains suggèrent que les entérotypes pourraient être utilisés comme outils pour déterminer des facteurs de risques face à certaines maladies ou des réponses possibles à des traitements médicamenteux. Cependant de nombreuses difficultés restent encore à surmonter pour cela, notamment au niveau de l'uniformisation des protocoles de recherche[104].

#### I.1.D.c) La dysbiose chez les patients atteints de MICI

Bien que les mécanismes exacts du développement des MICI n'aient pas été établis, il est généralement admis qu'elles impliquent la dérégulation du système immunitaire des patients contre les bactéries commensales ce qui provoque une inflammation chronique puis une lésion des tissus.

D'anciennes études *in vitro* ont montré que des lymphocytes T de la muqueuse intestinale, normalement insensibles aux antigènes microbiens, avaient une réponse immunitaire exacerbée lorsqu'ils étaient issus

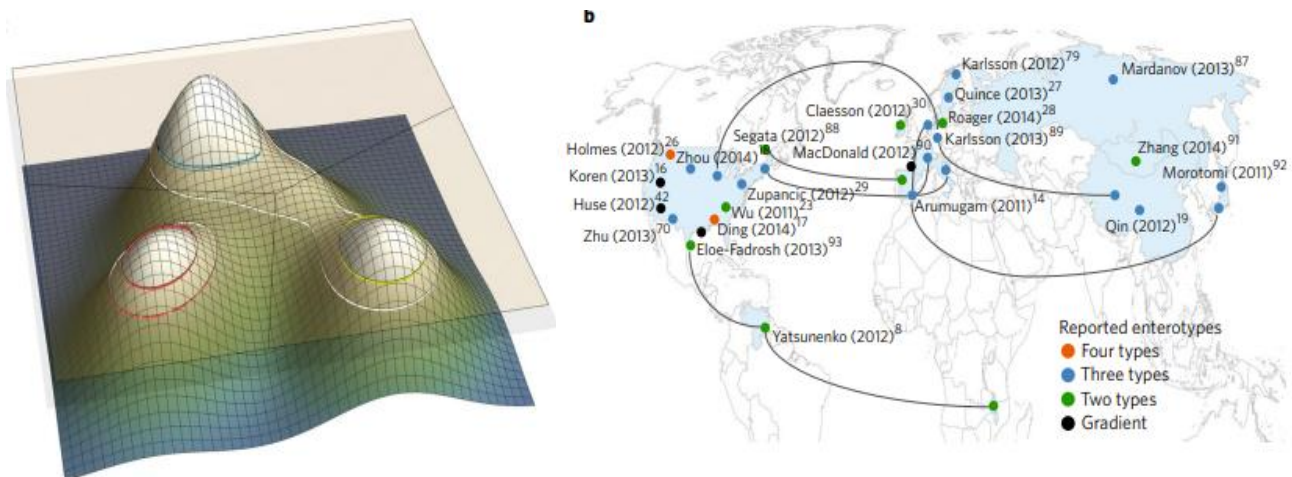


Figure 12. Représentation schématique des entérotypes observés dans différentes études de composition du microbiote intestinal à travers le monde (Paul I. Costea et al. 2018)

de patients atteints de la maladie de Crohn[105]. En clinique, la démonstration de cette réponse immunitaire contre les bactéries commensales repose sur le bilan sérologique des patients. En effet ils présentent un bilan positif contre de les marqueurs de nombreuses espèces comme *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), la porine C de la membrane externe d'*Escherichia coli* (Omp-C), la flagelline correspondant aux bactéries *Butyrivibrio*, *Roseburia*, *Thermotoga*, et *Clostridium* (cBir1) et *Pseudomonas fluorescens* (I-2). Les marqueurs sérologiques sont utiles pour différencier les MICI d'autres maladies inflammatoires ou d'infections et permettent également de classer les patients en fonction de la sévérité potentielle de leur maladie ou de risques plus élevés liés à certaines pratiques chirurgicales[106].

La chronologie exacte des évènements conduisant au développement d'une inflammation chronique de l'intestin n'est pas connue cependant on peut dire que différents facteurs génétiques et environnementaux perturbent l'équilibre intestinal et permettent à des organismes pathogènes opportunistes de s'installer et d'induire une inflammation locale qui peut évoluer en inflammation chronique (figure 13). Les patients atteints de MICI ont une dysbiose intestinale caractérisée par une baisse de la diversité globale du microbiote, une augmentation des *Enterobacteriaceae* et une diminution des *Bacteroidetes* et certaines *Firmicutes*. À plus petite échelle on constate une baisse de la diversité, la réduction de certaines souches bactériennes aux propriétés bénéfiques telles que *Faecalibacterium prausnitzii* et *Bifidobacterium*[107–110] et l'augmentation de certaines souches pathogènes comme les

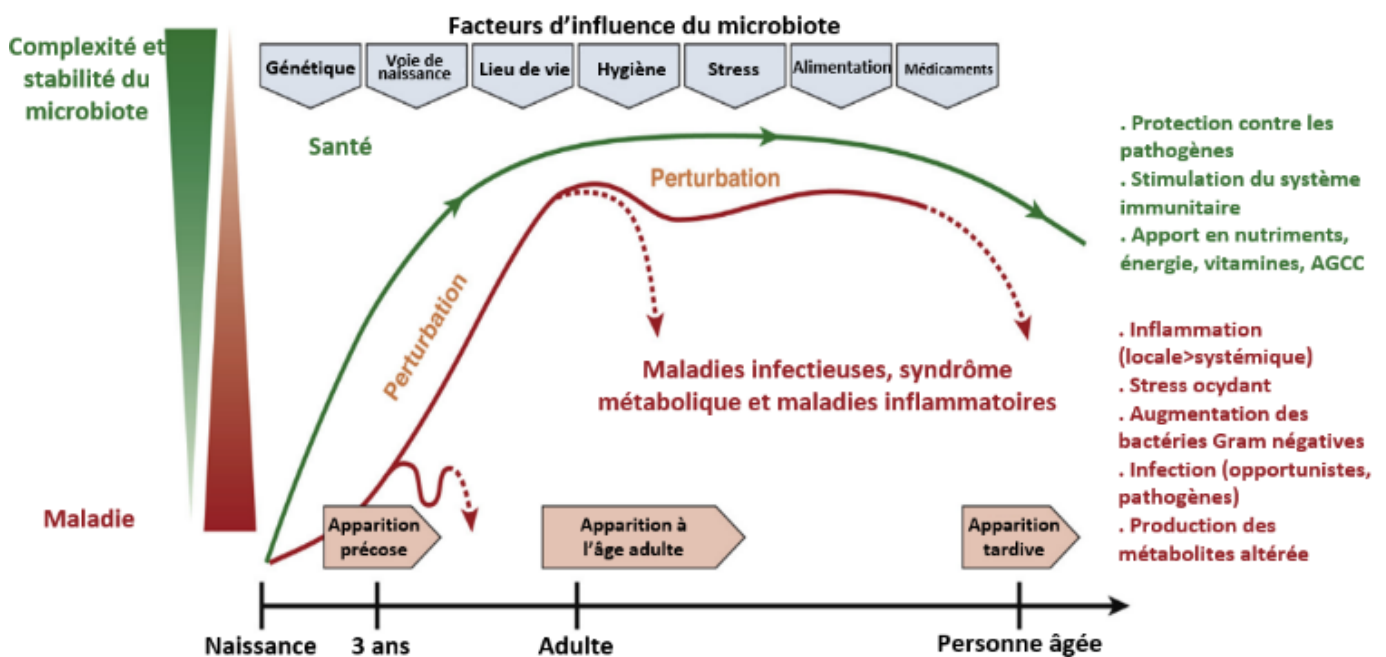


Figure 13. L'évolution de la complexité et la stabilité du microbiote intestinal au cours d'une vie et son lien à l'inflammation chronique de l'intestin (Aleksandar D. Kostic, Ramnik J. Xavier et Dirk Gevers. 2014)

*Escherichia coli* adhérentes et invasives (AIEC) qui sont corrélées à la forme iléale de la MC[111], les bactéries du genre *Desulfovibrio*[112] ou encore *Fusobacterium*[113,114] qui sont augmentées chez les patients atteints de RCH.

Assez vite, il a été suggéré que le microbiote intestinal avait un rôle causal dans le développement des MICI. En effet, les modèles génétiques de colite spontanées telles que les souris déficientes en IL-2 et IL10 ne développent pas la maladie lorsqu'elles sont élevées en conditions axéniques[96]. Une étude de 2007 a montré que le microbiote intestinal provenant de souris déficientes en facteur de transcription T-bet induisait la colite chez les souris saines[115]. Les souris KO pour le gène IL22 ont une faible production de mucus et une réduction de la sécrétion de plusieurs peptides antimicrobiens leur donnant une sensibilité à la colite induite qui est transmissible à des souris sauvages par leur microbiote[116]. Il semblerait donc que l'altération de la barrière intestinale, qu'on peut également retrouver chez les patients (voir I.1.D.a), favorise et entretient une flore colitogène.

#### I.1.D.d) La place du microbiote dans les stratégies thérapeutiques

Comme vu dans le point précédent, les patients atteints de MICI ont une dysbiose favorisant les bactéries Gram négatives du genre *Enterobacteriaceae* ainsi que divers pathogènes opportunistes. Il est possible d'agir sur le microbiote et de tenter de rétablir un microbiote plus sain par divers moyens. On constate par exemple que les patients traités par des anti-inflammatoires voient une forte réduction des bactéries du genre *Escherichia/Shigella*[33].

Un traitement aux antibiotiques est parfois prescrit aux patients pour lutter contre les infections de bactéries spécifiques. La ciprofloxacine, les aminoglycosides et la rifaximine sont utilisées pour lutter contre les infections à *E.coli*, le métronidazole est utilisé contre les infections à des bactéries anaérobies comme *Bacteroides fragilis*[117]. Des antifongiques peuvent être utilisés pour lutter contre *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* soupçonnée d'avoir un lien causal avec la MC[118]. Cependant les antibiotiques ont des effets secondaires importants comme la tendinite, la photosensibilité et peuvent causer des problèmes de croissance des os chez l'enfant. Ils peuvent également résulter en une infection nosocomiale notamment par *Clostridium difficile* -dont les conséquences sont plus graves pour les patients atteints de MICI que chez d'autres types de patients[119]- ou par des bactéries résistantes. De plus, après arrêt du traitement antibiotique, le patient peut avoir une forte recrudescence de bactéries dans sa muqueuse intestinale rendant le traitement contre-productif[117].

La transplantation de microbiote fécal (FMT) est une approche envisageable pour la modulation du microbiote qui a déjà fait ses preuves dans le traitement des infections à *C. difficile* et plusieurs ont suggéré de l'utiliser dans le traitement des MICI. Quelques études ont eu lieu avec des résultats encourageants mais variables[120–122]. La FMT permet la reconstitution de la population en *Bacteroidetes* chez des malades de la RCH après un traitement par antibiotiques[123]. Cependant l'efficacité de cette méthode sur la rémission des patients dépend grandement de la composition du microbiote donneur et sa compatibilité au receveur[124].

Les variations en genres bactériens du microbiote intestinal entre les personnes saines et les patients sont bien moindres (2%) par rapport aux variations de l'expression des gènes liés aux fonctions métaboliques du microbiote (12%). Cela signifie que soit 1) l'échelle des genres est trop imprécise pour identifier des différences pertinentes ou 2) la régulation d'un petit nombre de genres bactériens est suffisante pour provoquer d'importants changements métaboliques. On constate chez les patients atteints de MICI une augmentation de l'expression des gènes liés au métabolisme du stress oxydant. On peut également constater une réduction de l'expression des gènes liés au métabolisme des carbohydrates et de la biosynthèse des acides aminés en faveur des gènes liés au transport et à l'assimilation des nutriments[125].

On appelle « probiotiques » des microorganismes vivants qui, consommés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (cf. chapitre III). Ils proviennent de produits alimentaires fermentés ou préférentiellement de souches présentes dans le microbiote humain. Les bactéries des genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* sont des probiotiques grandement étudiés dans les modèles de colites pour leurs propriétés anti-inflammatoires[126–132]. L'espèce bactérienne *Faecalibacterium prausnitzii* a également reçu une attention particulière en raison de sa production de multiples composés anti-inflammatoires dont le butyrate[133–137] qui est connu pour inhiber la voie NF- $\kappa$ B[138] (voir plus dans la revue en annexe).

Malgré de nombreuses études sur modèles animaux il existe assez peu d'études cliniques démontrant l'efficacité des probiotiques sur les patients. Des études cliniques chez des patients atteints de MC ont été réalisées pour la levure *Saccharomyces boulardii*[139] et pour la bactérie *Lactobacillus rhamnosus* GG[140] sans succès. Une méta-analyse sur 22 études randomisées n'a pas pu trouver de preuves solides de l'efficacité des probiotiques dans le traitement de la MC que ce soit en phase de rémission ou en prévention des rechutes post-opératoires[141].

En revanche certaines souches montrent des résultats encourageants dans le traitement de la RCH. La souche *Escherichia coli* Nissle 1917, dont l'utilisation est répandue en Europe, montre qu'elle a un effet équivalent au traitement à la mesalazine dans le maintien de la rémission clinique des patients[142]. Le cocktail de probiotiques VSL#3 combinant 8 souches de bactéries lactiques (*L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) est l'une des préparations probiotiques les plus étudiées dans le traitement de la RCH et a montré une grande efficacité dans la rémission et son maintien chez l'adulte comme chez l'enfant[143].

Le manque de protocole standardisé rend difficile l'évaluation de l'efficacité des souches individuelles. De plus il est connu que les bactéries expriment des fonctions métaboliques différentes en fonction de leur environnement, ce qui inclue les nutriments et le microbiote de l'hôte. Par exemple la production en butyrate de *F. prausnitzii* est fortement augmentée lorsqu'elle est en co-culture avec une bactérie du genre *Bifidobacterium*[144]. Il semblerait donc pertinent de pousser la recherche vers une meilleure compréhension des interactions entre les bactéries afin de créer les meilleures combinaisons possibles plutôt que d'essayer de se reposer uniquement sur l'effet de souches isolées.



### I.1.E) Les modèles expérimentaux de colite

Il existe de nombreux modèles animaux destinés à l'étude des MICI. Ils peuvent être répartis en trois catégories de modèles : les souris génétiquement modifiées, les modèles d'induction chimique de la colite ou les modèles d'induction par transfert de cellules immunitaires activées.

#### I.1.E.a) Les modèles génétiques

Les souris « knock-out » (KO) pour le gène de l'IL-10 et l'IL-2 développent spontanément une inflammation de la paroi des intestins et du colon. Les souris KO IL-10 sont le modèle le plus couramment utilisé parmi les modèles génétiques. La maladie se développe au bout de 24 semaines et peut prendre des formes plus ou moins sévères en fonction de la souche murine. Par exemple les souris BALB/c présentent un phénotype bien plus sévère que les souris C57BL/6. De plus, il est possible d'élever des souris KO IL-10 en conditions axéniques puis d'induire un développement rapide de la maladie chez elles par FMT ce qui rend ce modèle très utile pour l'étude de l'impact bénéfique ou néfaste de certaines communautés microbiennes. Il existe de nombreux autres modèles monogéniques ciblant la régulation immunologique comme les souris TGF- $\beta$ 1 et TCR- $\alpha$  KO, ou la barrière intestinale comme les souris déficientes en kératine-8, N-cadhérine[145], mdr1a[146] ou muc2[147]. Une revue récente en a fait la liste complète[147].

Il existe également des modèles de souris développant spontanément la colite à cause d'une mutation. Le modèle Samp1/Yit développe une réponse immunitaire dans l'iléon qui se caractérise par une infiltration des lymphocytes T CD4+ et CD8 $\alpha$ +TCR $\alpha\beta$ + (cellules lymphoïdes innées) dans la *lamina propria*[148]. Le modèle C3H/HeJBir se caractérise par une inflammation dans la partie gauche du colon et a une réponse exagérée des lymphocytes B et T contre les antigènes des bactéries commensales[149].

Les modèles génétiques de ce genre sont utilisés pour comprendre et identifier chaque mécanisme et acteur intervenant dans la maladie mais sont limités dans l'étude étiologique de la maladie. En effet, chez les patients, la colite résulte rarement de la mutation d'un seul gène. De plus le développement de la maladie dans ces modèles prend beaucoup de temps et rend donc les études coûteuses et chronophages.

#### I.1.E.b) Les modèles immunologiques

Le transfert de lymphocytes T exprimant fortement CD45 (régulateur de l'activation des lymphocytes T et B) chez des souris immunodéprimées peut être utilisé pour induire une réponse immunitaire de type Th1 et cause une inflammation transmurale sévère avec une forte infiltration des neutrophiles dans les

tissus. Il est principalement utilisé pour étudier le rôle des lymphocytes T dans l'initiation et la régulation de la pathologie[150].

#### I.1.E.c) Les modèles d'induction chimique

Les modèles de colite par induction chimique sont les plus couramment utilisés. L'induction de la colite par le dextran sodium sulfate (DSS) est un modèle simple d'utilisation et très reproductible. Le DSS est distribué dans l'eau de boisson sur une courte période et provoque l'abrasion de la barrière épithéliale du colon. L'inflammation induite par ce modèle peut se produire indépendamment de la présence de lymphocytes T ce qui en fait un modèle approprié pour l'étude du système immunitaire inné[151].

L'administration intra-rectale de 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ou de dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) dans une solution d'éthanol provoque une inflammation avec une réponse immunitaire des lymphocytes auxiliaires de type 1 (Th1) et Th17. Ce modèle provoque des dommages rapides localisés au niveau du colon distal. L'inflammation dans ce modèle est généralement bien plus sévère que dans le modèle DSS et provoque une infiltration des lymphocytes T CD4+, des neutrophiles et des macrophages dans la barrière épithéliale[152].

Les modèles d'induction chimique permettent de faire des études courtes et peu coûteuses par rapport aux modèles génétiques. Ils permettent également l'étude des facteurs de régénération de la barrière intestinale car le cycle d'inflammation aiguë suivi d'une période de rémission ainsi que l'installation d'une inflammation chronique peuvent y être imités, ce qu'on ne retrouve pas chez les modèles de colite spontanée. Ainsi, les modèles d'induction chimiques sont souvent utilisés dans la recherche de nouveaux mécanismes de développement de la maladie et dans les preuves de concept pour des traitements potentiels.

Cependant les phénotypes observés peuvent grandement varier en fonction de l'âge, de la souche, du fournisseur d'animaux, du microbiote des animaux, du lot de produit chimique, de la durée et de la fréquence de l'administration. La concentration des produits utilisés doit être optimisée en fonction des conditions d'élevage.

De plus il faut garder en tête que ces modèles, bien que très utiles pour étudier les phases d'inflammation aiguës qui conduisent à la lésion des tissus, ne permettent pas de reproduire fidèlement les phases chroniques de la maladie.

## I.2) L'inflammation chronique dans l'obésité

### I.2.A) Présentation générale de l'obésité et ses enjeux

#### I.2.A.a) Epidémiologie et enjeux socio-économiques de l'obésité

La prévalence de l'obésité a fortement augmenté dans les 50 dernières années et concernait 19,5% de la population des pays de l'OCDE en 2017 (figure 14). D'après l'étude ESTEBAN 2014-2016 la prévalence de l'obésité est de 17% sans distinction des sexes en France et celle du surpoids de 54% chez les hommes et 44% des femmes. En comparant cette étude aux données ENNS-2006 il semblerait que cette prévalence soit restée stable dans les années récentes[153].

L'obésité est un enjeu de santé publique majeur dans le monde entier et sa vitesse de propagation la fait qualifier de pandémie. L'obésité grave (IMC>45) est un facteur de risque majeur au développement de maladies non transmissibles et est associée à une baisse de l'espérance de vie de 5 à 20 ans[154]. On estime que chaque année l'obésité contribue au décès de 2.8 millions de personnes, et à celle de 3.4 millions de personnes si on y ajoute le surpoids, ce qui en fait la 5<sup>e</sup> cause de mortalité dans le monde[155]. En 2012, 6% des nouveaux cas de cancers étaient liés à l'obésité ou au diabète. Une fraction qui varie en fonction du pays. En effet les pays d'Asie comme la Chine, l'Inde ou le Japon ont davantage de cancers liés au diabète de type 2 tandis que dans les pays occidentaux l'obésité est une cause plus importante dans le développement de cancers[156](figure 15). Une situation d'autant plus inquiétante que la prévalence de l'obésité continue d'augmenter non seulement dans les pays développés mais également dans les pays en voie de développement dont les modes de vie s'occidentalisent. Cette épidémie touche principalement les populations des classes populaires et contribue aux inégalités sociales, l'obésité étant un facteur de risque au développement de handicaps physiques ou psychologiques pouvant limiter la capacité à travailler[157].

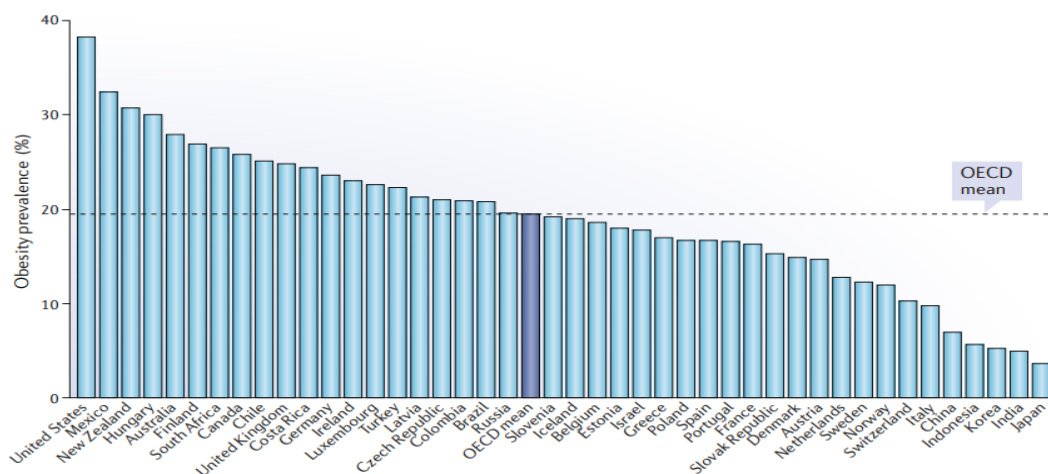


Figure 14. Prévalence de l'obésité dans les pays de l'Organisation de coopération et de développement économiques (Matthias Blüher 2019).

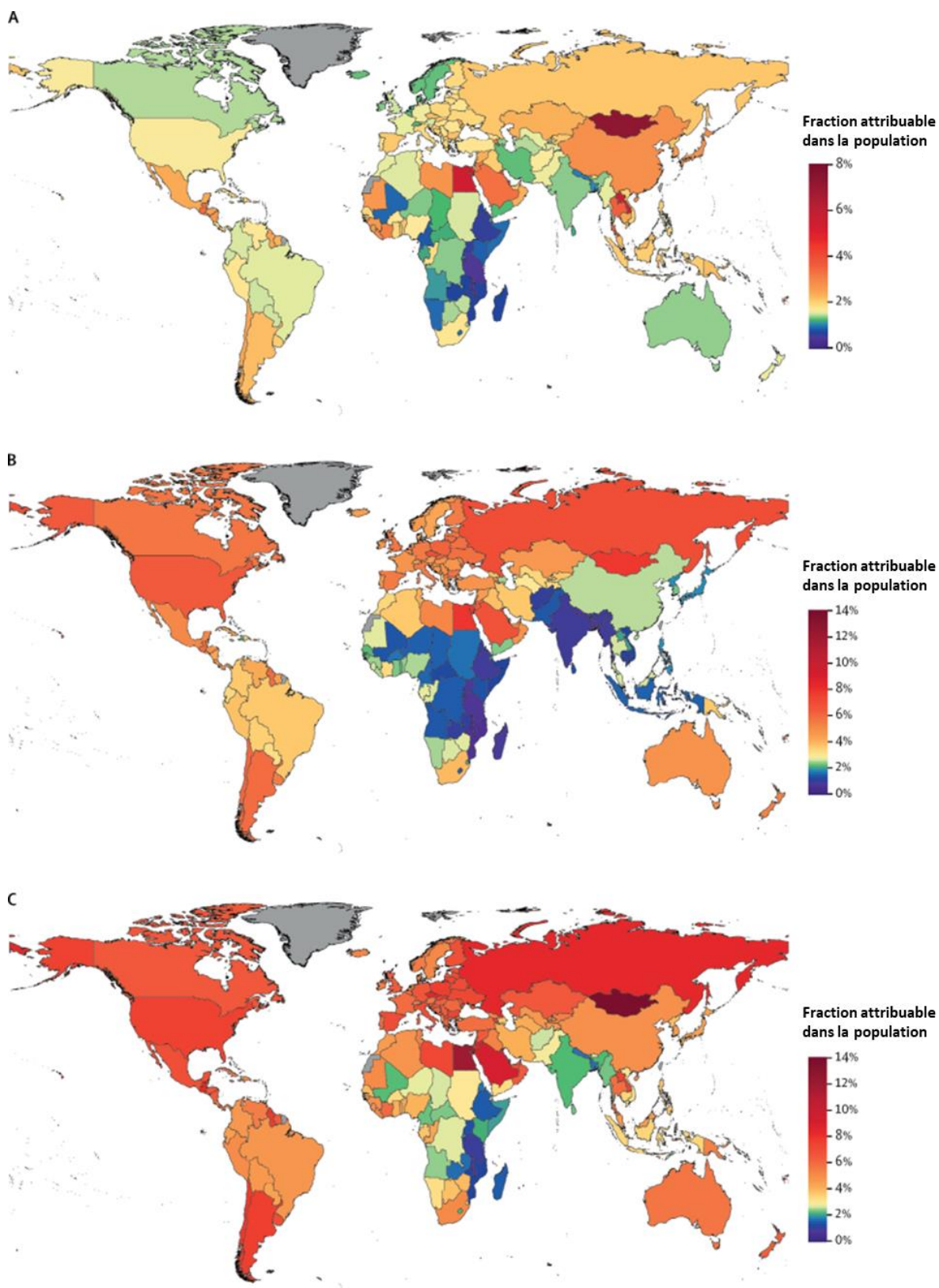


Figure 15. Fraction attribuable des nouveaux cas de cancer à a) le diabète b), l'obésité ou c) la combinaison des deux, par pays en l'an 2012 (Pearson-Stuttard J, Zhou B et al. 2018).

En France les maladies liées à l'obésité représentent 4.9% des dépenses de santé et 2.7% du PIB total[158] et représente un surcoût important pour le contribuable, bien qu'en deçà de la moyenne des pays de l'OCDE.

Cependant la malnutrition et l'obésité constituent un marché considérable pour les acteurs industriels qui contribuent à générer les comportements alimentaires à risque et ceux cherchant à proposer des solutions de régime pour les corriger. En juin 2020, Santé Publique France rapporte que le marketing des produits alimentaires représente 1,1 milliards d'euros dont 48% sont consacrés à des produits dont le Nutri-Score est de E et D. La publicité sur internet prend une part de plus en plus importante d'autant plus qu'elle ne fait pas l'objet de restrictions d'horaires et de public contrairement à la publicité télévisée[159].

De plus la désinformation constante et les apparentes contradictions dans lesquelles baigne le grand public sur les questions de nutrition contribue à la confusion sur les recommandations à suivre, voire à leur rejet. Une part importante de la population se renseigne sur des blogs ou les réseaux sociaux et suivent les recommandations de célébrités et d'influenceurs. Or ce type recommandations en ligne correspond rarement aux recommandations nutritionnelles gouvernementales ou alors sont trop restrictives et peuvent entraîner l'aggravation des problèmes de carences alimentaires[160,161].

#### I.2.A.b) Facteurs génétiques et environnementaux dans le développement et le maintien de l'obésité

L'obésité est une condition multifactorielle dont le déclencheur est un excès de calories sur une période relativement longue accompagné d'un manque d'activité physique (figure 16). Elle résulte en un dérèglement des mécanismes de régulation du métabolisme des nutriments qui rend la perte de poids très difficile.

D'un point de vue évolutionniste, la sélection naturelle a sans doute avantage les génotypes favorisant un métabolisme énergétique pouvant stocker les ressources le plus efficacement possible afin de survivre aux nombreuses périodes de famine auxquelles les humains devaient faire face avant la Révolution verte et l'industrialisation des pays occidentaux puis du reste du monde. Dans le contexte de surabondance alimentaire actuel, la prévalence de l'obésité et des troubles associés progresse plus vite que la sous-nutrition ne recule[162].

Différentes populations humaines ont fait face à différentes pressions sélectives ce qui explique en partie la variation ethnique dans la distribution de l'obésité[163]. Par exemple les habitants des îles du Pacifiques ont une augmentation du taux de l'obésité dans leur population quatre fois plus rapide que la moyenne internationale[164]. Des études sur jumeaux et sur enfants adoptés montrent que l'IMC des enfants adoptés correspond à celui de leur famille biologique plutôt qu'à celui de leur famille adoptive[165–167], confirmant l'importance de l'héritabilité dans le développement de l'obésité. Des mutations sur les gènes impliquant la voie de la satiété, notamment la leptine et son récepteur, peuvent provoquer une obésité importante chez l'humain dès l'enfance[168,169] cependant ce type de mutation est rare et n'explique pas l'explosion des chiffres de l'obésité du dernier demi-siècle.

Dans la grande majorité des cas, la prédisposition génétique à l'obésité est polygénique. Une étude récente a établi un score de risque polygénique de l'obésité permettant d'identifier les risques de

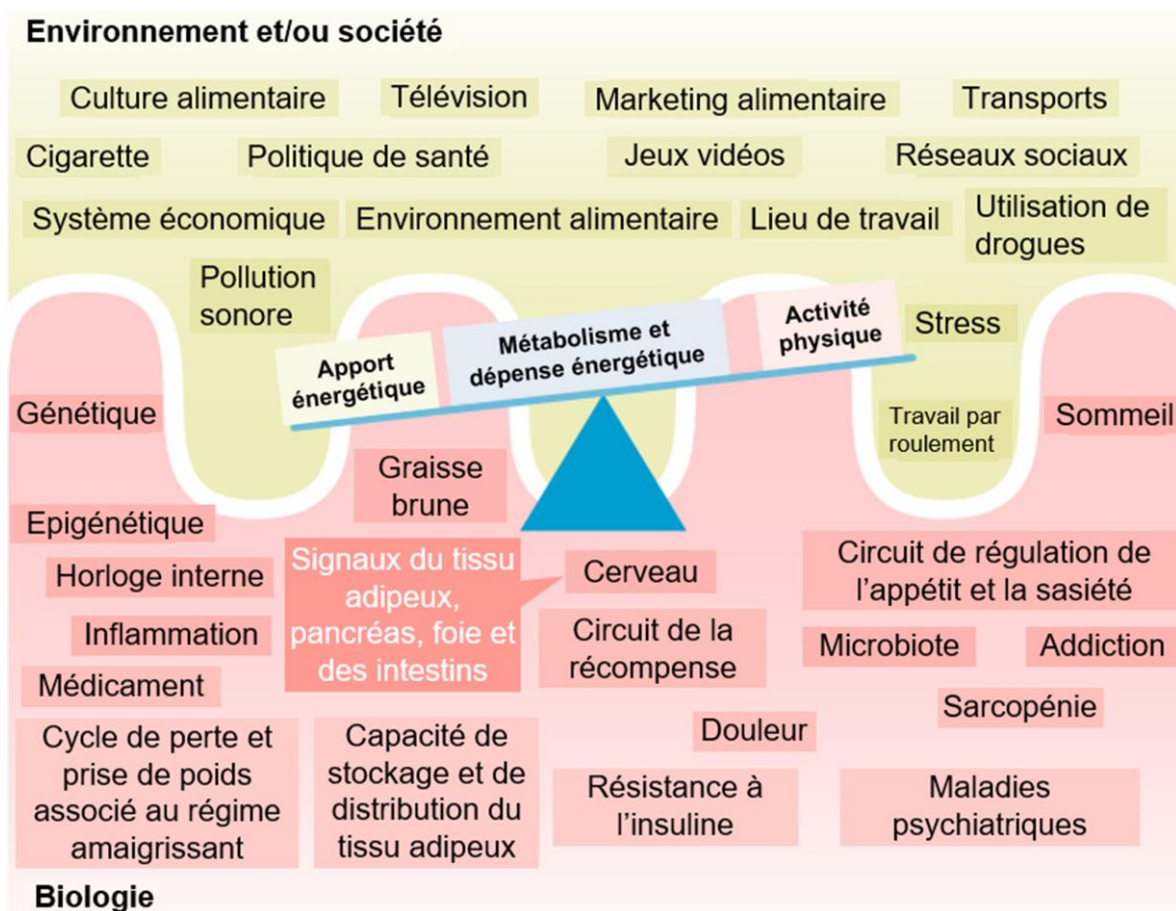


Figure 16. Facteurs pouvant influencer la balance énergétique et le développement de l'obésité (traduit d'après Matthias Blüher 2019).

développer l'obésité chez l'adulte (parfois équivalents aux risques retrouvés chez des patients ayant de rares mutations monogéniques)(figure 17)[170].

Le mode de vie occidental urbain et tout ce qui lui est associé est fortement obésogène. Cela inclue : la consommation d'aliments transformés, la réduction de l'activité physique, l'utilisation accrue des écrans à la fois dans le divertissement et le travail sédentaire ainsi que le marketing de l'industrie agro-alimentaire favorisant les aliments riches en sucres, l'omniprésence des fast food et les portions importantes de la restauration collective[164]. Des facteurs sociaux et psychologiques comme le stress lié au travail, à la situation financière ou aux relations personnelles, la dépression et la discrimination jouent également un rôle important dans le gain de poids[171–173].

Le marketing est un important facteur de modulation du comportement alimentaire, particulièrement chez les enfants. Certains facteurs génétiques (comme le gène FTO) impliqués dans les circuits de récompense jouent un rôle important dans la régulation du comportement alimentaire et la capacité de contrôle de l'individu sur sa faim et rend les personnes portant des allèles mutants plus susceptibles au marketing[164]. Une méta-analyse sur 17 études montre que les mesures et les campagnes d'incitation à la pratique sportive et à l'amélioration des habitudes alimentaires n'ont aucun effet significatif sur les habitudes de vie de la population[174]. Cela questionne la pertinence des approches ciblant les comportements individuels pour améliorer ces questions de santé publique.

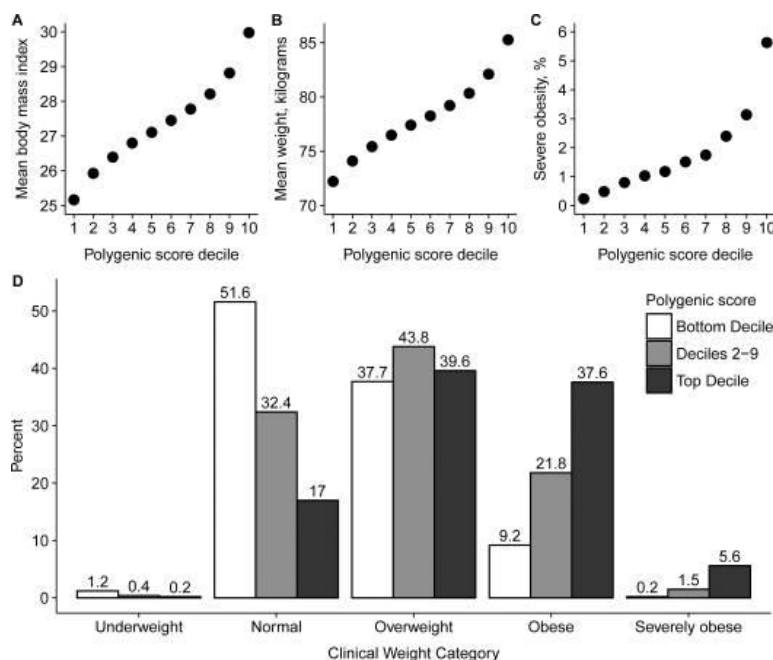


Figure 17. Relation entre la distribution du score de risque polygénique et celle de l'IMC, du poids et de l'obésité sévère (Amit V. Khera, Mark Chaffin et al. 2019).

Une perte de poids modeste de 5 à 10% maintenue sur le long terme serait pourtant suffisante pour réduire significativement le taux de cholestérol et la pression artérielle systolique et diastolique ainsi que dans la qualité de vie des patients[175]. Cependant ces objectifs médicaux se heurtent aux objectifs personnels « irréalistes » des patients. Une étude sur 60 femmes en état d'obésité montre que l'objectif moyen chez ces patientes était d'une perte de poids de 32%. Une perte de poids de 17kg (correspondant à 17% du poids pour la moyenne des participantes) était perçue comme un échec[176]. La société, y compris les personnels de santé, et les patients eux-mêmes tendent à faire reposer la responsabilité de l'échec de leurs objectifs sur un « manque de volonté ». Le cycle de gain et de perte de poids incessant malgré les efforts des patients et la stigmatisation conduisent à un sentiment de culpabilité, un découragement et une perte de confiance envers le corps médical.



## I.2.B) Physiopathologie de l'obésité et du diabète de type 2

### I.2.B.a) Dérèglement hormonal du comportement alimentaire et du métabolisme énergétique

Beaucoup simplifient leur approche de l'obésité en un simple problème d'apport énergétique. Cependant de nombreux facteurs métaboliques et hormonaux entrent en jeu dans la réponse individuelle à l'exercice et au régime dans la perte de poids. L'approche par restriction calorique reste aujourd'hui prioritaire dans le traitement de l'obésité. Cependant son maintien à long terme est d'une grande difficulté et la moitié du poids perdu par les patients est repris dans les deux ans qui suivent le régime[177]. Une grande partie des patients regagnent même plus de poids qu'ils n'en avaient perdu. En outre le succès de la perte de poids semble être principalement lié au temps de suivi après celle-ci.

La perte de poids par réduction de la prise alimentaire est un stress pour le corps et s'accompagne par une baisse des besoins énergétiques qui se maintient sur le long terme dans un processus que l'on appelle la « thermogénèse adaptative »[178,179].

Le comportement alimentaire et le métabolisme des nutriments sont fortement régulés par de nombreux neuropeptides, neurotransmetteurs et hormones par des mécanismes homéostatiques et

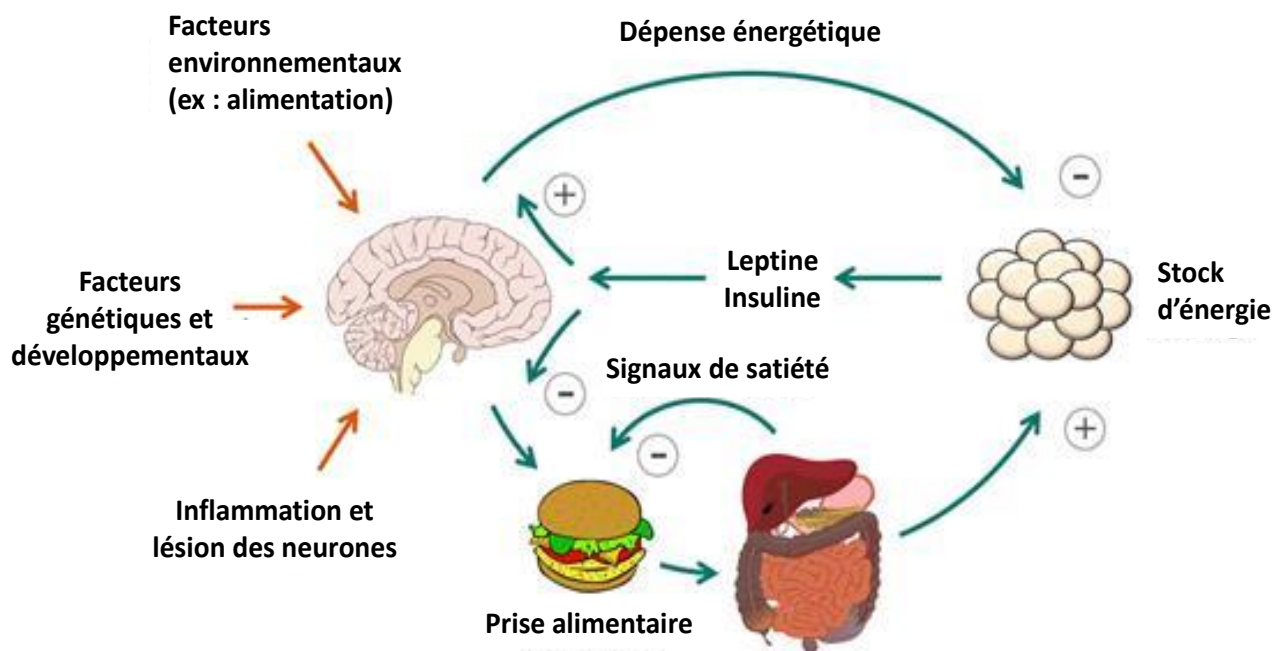


Figure 18. Régulation de la prise alimentaire et de la prise de poids par le système nerveux central (traduit d'après Stephan J. Guyenet et Michael W. Schwartz, 2021). Le SNC régule la prise de poids en ajustant la prise alimentaire et la dépense énergétique en réponse aux différents signaux de satiété. Différents facteurs génétiques et environnementaux (accessibilité à une nourriture savoureuse a fort potentiel énergétique, activité physique, etc) ainsi que des facteurs de développement, l'état d'inflammation de l'hypothalamus ou des atteintes neuronales peuvent influencer la prise de poids.

hédoniques. Les principaux centres de régulation de la prise alimentaire se retrouvent dans l'hypothalamus, une structure du système nerveux central (SNC). On y retrouve des récepteurs de la leptine (« hormone de satiété »), la ghréline (« hormone de la faim ») et l'insuline. La leptine et l'insuline sont les principales hormones de contrôle du métabolisme des nutriments et du tissu adipeux ; elles inhibent la faim et induisent l'absorption du glucose par les cellules adipeuses[180,181] (figure 18).

L'absence d'expression de la leptine provoque un fort appétit et une sévère obésité chez l'humain comme la souris[168,169,182]. Elle agit en inhibant la production de sérotonine qui favorise l'appétit[183]. Cependant, le taux de leptine dans la circulation sanguine est corrélé avec le pourcentage en graisse corporelle chez l'humain[184]. L'hyperleptinémie retrouvée chez les patients obèses conduit donc au développement d'une résistance à la leptine au niveau du SNC comme on peut le constater sur des modèles d'animaux nourris avec un régime sur-gras[185,186].

La perte de poids induit une réduction du taux de leptine circulant qui se traduit par une augmentation de l'appétit, poussant à la reprise de poids du patient[187]. Les souris *ob/ob* souffrent d'hypothermie qui se corrige par l'administration de leptine[188]. De plus elles ont du mal à adapter leur prise de nourriture en fonction de leurs besoins énergétiques comme le font les souris wild type[189]. Singh Amandeep et al. rapportent que 30% de la perte de poids induite par un traitement à la leptine est liée à des changements dans la dépense énergétique[190]. Cependant, les traitements à la leptine ne sont pas efficaces dans le traitement de l'obésité chez les patients.

Certains traitements médicamenteux agonistes de neurotransmetteurs (comme la lorcasérine, agoniste de la sérotonine) ont un effet raisonnable sur la prise de poids cependant ils posent un risque non négligeable en raison de nombreux effets secondaires sur la santé des patients, notamment cardiovasculaires, carcinogènes ou dépressifs, et nombre d'entre eux ont été retirés du marché[191].

#### I.2.B.b) Alimentation, endotoxémie métabolique et développement de l'insulino-résistance

Il est actuellement reconnu que l'obésité se caractérise par une inflammation chronique de bas grade systémique qui résulte ultimement au développement de la résistance à l'insuline.

Un régime sur-gras, chez l'homme comme chez l'animal, conduit à une augmentation du taux de LPS circulant qui correspond à une « endotoxémie métabolique »[192]. Le LPS se diffuse de façon passive à travers la barrière intestinale jusque dans la circulation sanguine lorsque l'intégrité de cette barrière est perturbée et sa perméabilité augmentée. Il peut également être transporté par les chylomicrons (particules lipidiques transportant des triglycérides alimentaires dans le sang) qui se forment lors de la

digestion des graisses[193]. Chez la souris il est démontré que la graisse, indépendamment de l'apport calorifique, facilite le passage du LPS dans le sang[194].

Une étude expérimentale comparant deux groupes de dix personnes saines à poids ordinaire, l'un nourri avec un repas riche en graisses (42%) et l'autre avec un repas comprenant plus de fibre et moins de graisses (27%) montrent que le LPS circulant augmente de façon significative entre 3 et 5h après un repas gras. Une étude de population française a établi un lien entre LPS circulant à jeun et l'apport en graisses et calories dans les habitudes alimentaires de 1015 personnes saines[194]. La concentration en endotoxines dans le sang est associée à un plus haut risque de souffrir d'évènements cardio-vasculaires. Elle est plus élevée chez les patients atteints de diabète de type 2 et par ailleurs une concentration élevée d'endotoxine chez un patient sain est fortement associée au développement du diabète de type 2 dans les 10 ans qui suivent la mesure[193].

Il est démontré que le LPS cause une perturbation des jonctions serrées de la barrière intestinale *in vitro* et *in vivo* impliquant une augmentation de l'expression de TLR-4 à la surface de la membrane des entérocytes[195]. Les repas trop riches induisent donc une inflammation transitoire à terme conduit à une inflammation chronique (figure 19).

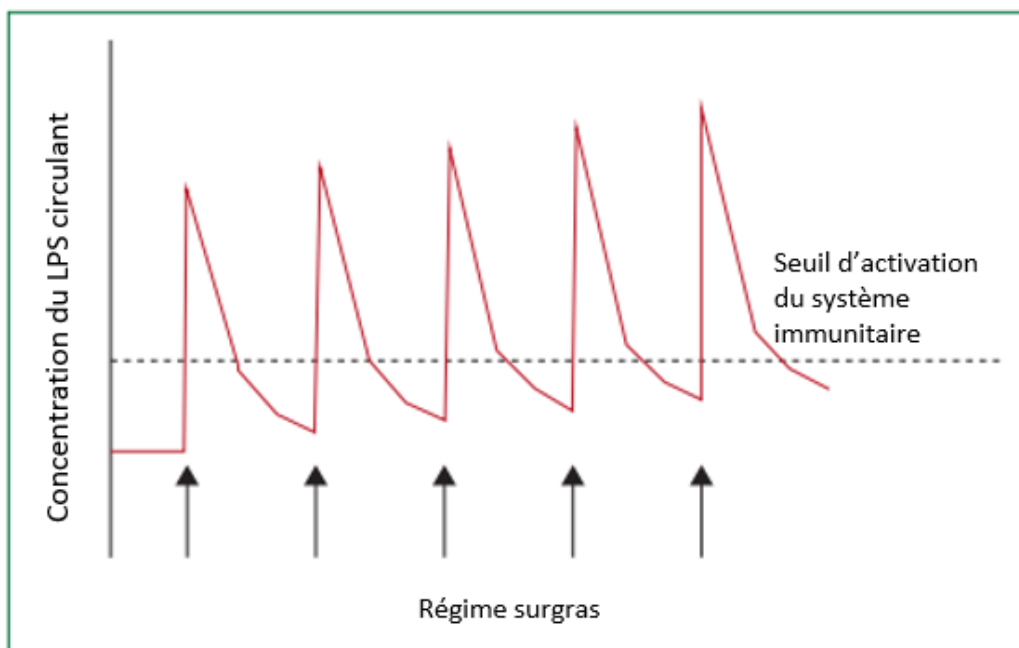


Figure 19. Modèle proposant comment l'augmentation transitoire du LPS circulant après un repas riche en graisse pourrait conduire à une inflammation chronique de bas grade (traduit d'après Amanda J Cox, Nicholas P West, Allan W Cripps, 2015).

### I.2.B.c) L'inflammation : acteur clé de la pathologie

L'obésité est caractérisée par une inflammation chronique de bas grade locale et systémique. Une méta-analyse comprenant 51 études indépendantes trouve une corrélation entre l'IMC et le taux de protéine réactive C (CRP), notamment chez les femmes[196]. Les données épidémiologiques associent l'obésité à un risque accru de développement de nombreuses maladies dont les MICI. Les régimes sur-gras exacerbent la colite et le développement du cancer colorectal[197–199] chez la souris dans les modèles d'induction chimique et les modèles de colite spontanée[200–202].

Nous avons vu précédemment qu'un repas gras se suit d'un pic de LPS circulant. L'activation du TLR4 par le LPS va conduire à l'activation des voies pro-inflammatoires, comme le myeloid differentiation factor 88 (MyD88) ou le nuclear factor kB (NFkB), entraînant une hypoglycémie transitoire dont la rémission est liée au développement à long terme de l'hyperglycémie[203–205].

A l'échelle locale, on constate chez les souris C57BL/6 une surexpression iléale de TNF- $\alpha$  à partir de 2 semaines d'alimentation surgrasse, bien avant la prise de poids et l'inflammation systémique. Cette observation est d'autant plus importante que l'expression relative de TNF- $\alpha$  dans les premières semaines est fortement corrélée avec la prise de poids et le développement de la résistance à l'insuline à 16 semaines[206].

Une étude sur des femmes obèses a démontré qu'une perte de 10% de leur poids permettait une forte baisse (entre 25% et 57%) de l'expression de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, et MCP-1 ainsi qu'une diminution de l'infiltration par les lymphocytes T et les macrophages de 28% et 42% dans la muqueuse[207].

Plusieurs mécanismes d'actions sont envisagés pour expliquer l'élévation des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans la circulation sanguine des patients obèses. Le tissu adipeux étant un organe endocrine source de nombreuses hormones, facteurs de croissances et comprenant de nombreuses cellules du système immunitaire, la surcharge en graisses des adipocytes induirait un stress cellulaire ou une infiltration des macrophages dans le tissu adipeux qui conduirait à l'activation de cascades de réactions inflammatoires.

De nombreux biomarqueurs de l'inflammation comme le Tumor Necrosis Factor Receptor II, la fibrinogène, la CRP et l'IL-6 permettent de prédire les incidents cardiovasculaires et les risques de mortalité chez un patient[208,209] ainsi que le développement du diabète de type 2[210,211]. La relation de causalité entre obésité, inflammation et le développement du diabète de type 2 est généralement considérée comme établie cependant les mécanismes exacts restent à élucider.

### 1.2.C) Obésité et dysbiose

La réponse du système immunitaire au gras dans les intestins et la modulation du microbiote intestinal par différents modes d'action ont un lien de cause à effet avec le développement du syndrome métabolique. La consommation accrue en sucre et graisses dans l'alimentation occidentale après la seconde guerre mondiale a conduit à une forte augmentation de la prévalence de l'obésité. L'alimentation riche en graisses modifie la composition du microbiote intestinal et provoque une inflammation de bas grade qui participe à la pathogénèse du syndrome métabolique.

#### 1.2.C.a) Interactions entre le microbiote intestinal et le métabolisme des nutriments

Wostmann *et al.* ont montré en 1983 que les rats axéniques avaient besoin d'un apport calorique supplémentaire de 30% pour maintenir leur poids par rapport à des souris conventionnelles[212]. Plus récemment une étude américaine a montré que l'accumulation de graisses chez des souris C57BL/6 élevées en conditions axéniques, lorsque du microbiote issu de souris conventionnelles leur est transféré, augmente de 60% et qu'elles développent la résistance à l'insuline et ce malgré une réduction de leur prise alimentaire[213]. Cela peut s'expliquer par une augmentation du flux de carbohydrates vers les tissus adipeux et le foie et le développement de la stéatose hépatique (figure 20) en raison de la stimulation de l'expression des voies impliqués dans le métabolisme des carbohydrates comme ChREBP et la réponse stéroïdienne comme SREBP-1 qui contrôlent l'expression de l'acetyl-CoA carboxylase (Acc-1) et la fatty acid synthase (Fas)[213].

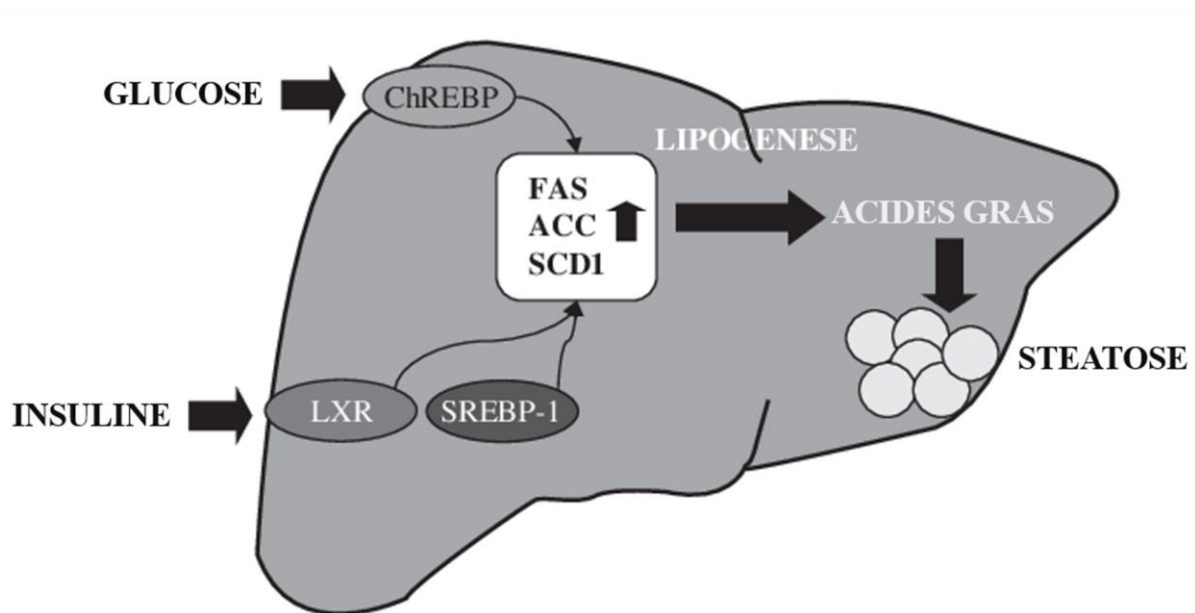


Figure 20. Métabolisme lipidique dans le développement de la stéatose hépatique ( traduit d'après C. Postic, J. Girard 2008).

Les carbohydrates sont la principale source d'énergie de l'alimentation humaine. Les mammifères peuvent hydrolyser les disaccharides (sucrose, lactose, maltose) et une partie de l'amidon de leur alimentation mais ont une capacité limitée de digestion des polysaccharides issus des plantes tels que la cellulose, le xylane et les pectines, qui transitent vers la partie distale de l'intestin où le microbiote intestinal peut les dégrader. Le microbiote intestinal a une relation symbiotique avec son hôte permettant à chacun des acteurs d'avoir accès à des nutriments qu'ils ne pourraient exploiter pleinement seuls et qui seraient donc gâchés[214]. Ainsi les *Bacteroidetes*, phylum le plus abondant du microbiote intestinal, sont les principaux utilisateurs des polysaccharides et la capacité à métaboliser l'amidon de *Bacteroides thetaoimicron* est très étudiée[213].

Peter J. Turnbaugh et al. ont déterminé par analyse métagénomique du microbiote de souris ob/ob que le microbiote de celles-ci était plus efficace pour l'exploitation énergétique des aliments. En effet le microbiote de ces souris diffère de celui de souris wild-type et s'accompagne par une plus grande quantité d'acétate et de butyrate dans leur contenu caecal tandis qu'on constate également une baisse significative du contenu énergétique de leurs fèces excrétés[215]. Cela signifie qu'une quantité plus importante d'énergie a été utilisée ou absorbée au niveau de l'intestin. De plus le transfert de microbiote de souris obèses à souris non obèse provoque leur prise de poids[215]. Il en est de même chez le rat[214]. On observe également une corrélation entre l'obésité et la concentration en certains acides gras à chaîne courte (AGCC ou SCFA en anglais) dans les fèces des patients[216]. Les AGCC comprennent une multitude de métabolites dont les propriétés varient.

Les AGCC sont les produits principaux de la fermentation des carbohydrates par les bactéries ainsi que la source principale d'énergie des colonocytes, ce qui en fait des produits cruciaux pour la santé gastrointestinale (figure 21). On estime en effet que 4 à 10% de l'énergie extraite de l'alimentation humaine est issue de la production d'AGCC par les bactéries du colon[217].

Les plus abondantes sont l'acétate, le propionate et le butyrate qui représentent 95% des AGCC présents dans le colon et les fèces dans un ratio moléculaire d'approximativement 60:20:20. 95% de la production en AGCC est rapidement absorbée par les colonocytes et les 5% restants sont expulsés avec les fèces[218]. Individuellement, les AGCC n'ont pas les mêmes propriétés pour l'organisme. Le butyrate est principalement consommé par les colonocytes et permet leur maintien tandis que l'acétate passe en majorité dans la circulation sanguine. Les colonocytes des souris axéniques sont en état constant de carence énergétique et finissent par entrer en autophagie qui peut être prévenue par l'administration de butyrate ou de bactéries productrices de butyrate, témoignant de l'importance de cette molécule dans le métabolisme énergétique de la barrière intestinale[219].

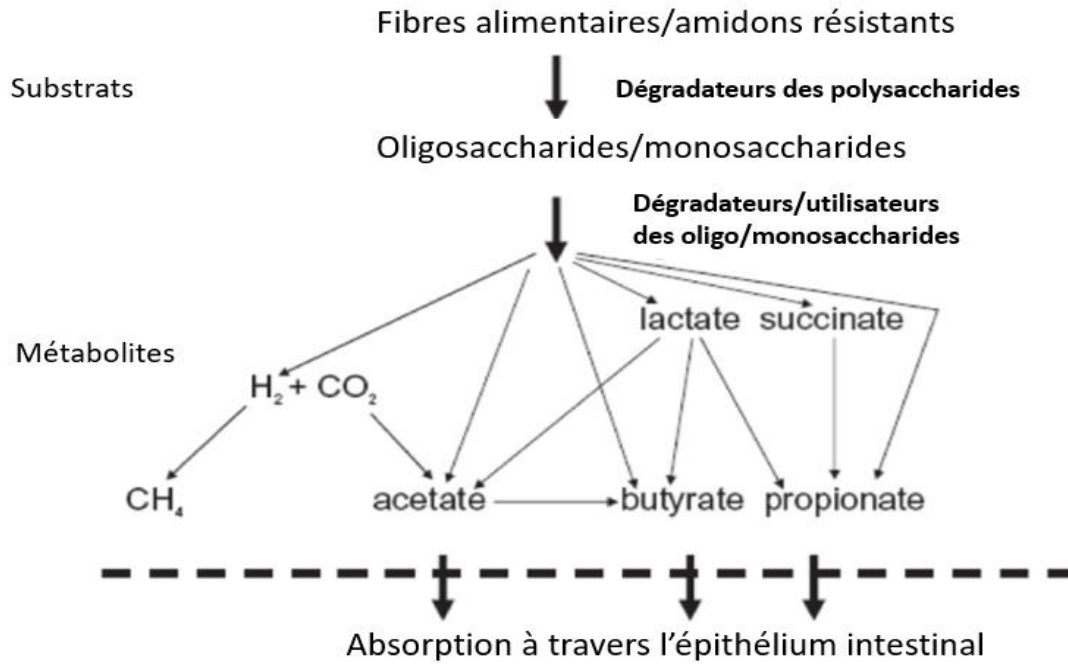


Figure 21. Fermentation des glucides en acides gras ayant lieu dans le colon (traduit d'après Scott, K. P., Duncan, S. H. and Flint, H. J. (2008), " Dietary fibre and the gut microbiota " , Nutrition Bulletin, 33: 201–211. Copyright (2008) by British Nutrition Foundation).

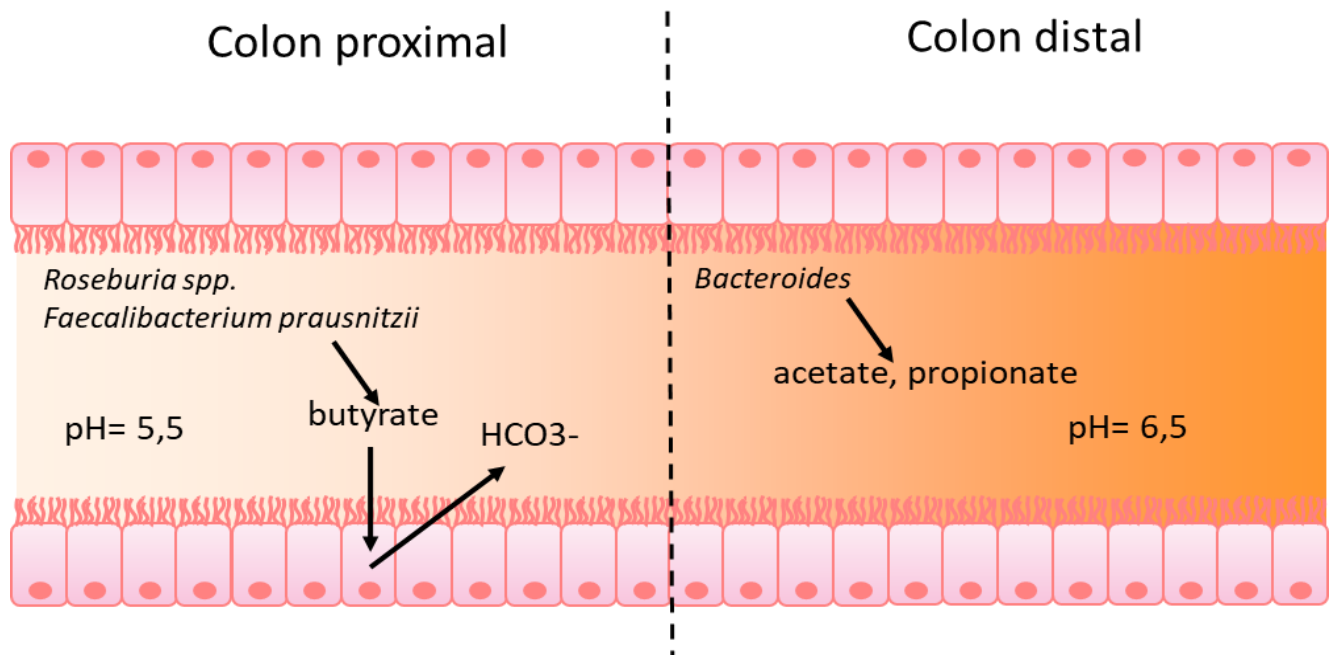


Figure 22. Interactions entre microbiote, production d'AGCC et pH du colon (à partir des données de la revue de Gijss den Besten et al. 2013). Le pH du colon proximal entretient un microbiote composé à 20% de Roseburia spp et Faecalibacterium prausnitzii, des bactéries productrices du butyrate. Les colonocytes absorbent le butyrate en échange de bicarbonate ( $HCO_3^-$ ) qui va progressivement diminuer l'acidité du colon. Dans la partie proximale, les bactéries productrices de butyrate disparaissent au profit des Bacteroides productrices d'acétate et de propionate.

La production en AGCC du microbiote varie fortement en fonction du type de fibre consommé. Gijssels et al. listent les effets des différentes fibres sur la composition fécale en AGCC chez le rat, le porc et l'humain[218]. De plus la production d'AGCC varie localement dans l'intestin et influence également sa composition dans des interactions complexes entre hôte et bactéries (figure 22).

Les effets des AGCC sur le métabolisme énergétique et la santé humaine sont à la fois intéressants et paradoxaux. En effet les AGCC (notamment le butyrate) sont communément admis comme des facteurs de prévention du risque de développer l'obésité, le diabète et diverses maladies intestinales comme les MICI ou le syndrome de l'intestin irritable de par leurs propriétés anti-inflammatoires[220]. On leur attribue notamment un rôle de régulation des hormones intestinales et une réduction de la prise alimentaire via le récepteur FFAR3[221]. Pourtant ils sont également une source supplémentaire de calories chez les animaux avec un microbiote « obésogène »[215].

### I.2.C.b) Obésité et composition du microbiote intestinal

La relation entre le microbiote intestinal et l'obésité est connue depuis les années 80 où on a constaté que les techniques chirurgicales pour induire la perte de poids telles que le bypass gastrique entraînent un changement de la composition du microbiote intestinal[222]. A l'époque on ne disposait que des techniques de culture bactérienne pour établir ces comparaisons. Depuis, des techniques comme le séquençage du 16S ribosomique, les PCR quantitatives ou le séquençage de génome complet se sont développées et permettent d'étudier la vaste population de bactéries anaérobies encore non cultivables à ce jour ainsi que leurs fonctions métaboliques.

D'anciennes études suggèrent une association entre le ratio des *Firmicutes* et *Bacteroidetes* et l'obésité. Les souris ob/ob ont ainsi une augmentation significative du taux de *Firmicutes* et une diminution forte des *Bacteroidetes* par rapport à des souris wild-type ayant reçu le même régime[223]. On retrouve également cet enrichissement en *Firmicutes* et en *Proteobacteria* au dépend des *Bacteroidetes* chez les souris en régime sur-gras, indépendamment du développement de l'obésité[224]. Chez l'homme, une étude comparant le microbiote d'enfants vivant en zones rurales africaines, dont l'alimentation est riche en fibres, à des enfants occidentaux, dont l'alimentation est riche en protéines, en graisses et en sucres, montre également cette association entre régime gras et une diminution des *Firmicutes* en faveur des *Bacteroidetes*[225]. Cependant l'utilisation de ce ratio comme marqueur de risque est très controversée. En effet, de nombreuses études montrent des résultats contredisant son importance et suggère que les changements de composition à l'échelle du genre voire de l'espèce seraient plus pertinents à étudier[226].



De plus les *Firmicutes* sont des producteurs de butyrate[227] qui est un acide gras à chaîne courte avec des propriétés bénéfiques sur la santé notamment par ses propriétés anti-inflammatoires[138] et régulatrices du métabolisme énergétique[228,229]. Les patients obèses auraient plutôt une diminution des *Firmicutes* productrices de butyrate au profit d'autres bactéries du même Phylum. Par exemple l'augmentation de *Staphylococcus* spp. et *Lactobacillus* spp. est positivement associée à l'apport énergétique et l'inflammation dans l'obésité respectivement[230]. En revanche la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*, une des principales productrices de butyrate chez l'homme, est diminuée chez les patients atteints d'obésité[231] et sa proportion ré-augmente après la perte de poids[232].

Les données du Guangdong Gut Microbiome Project, une étude cross-sectionnelle impliquant 6896 participants chinois, ont dénoté une association entre la baisse de l'abondance des bactéries du genre *Akkermansia* et le développement du syndrome métabolique. De plus ces bactéries sont positivement corrélées au genre *Ruminococcaceae* et *Bacteroidaceae*, et négativement corrélées aux genres *Lachnospiraceae* et *Prevotellaceae*[233].

#### I.2.C.c) La place du microbiote dans les stratégies thérapeutiques

Le microbiote intestinal impacte le développement et la progression de l'obésité en augmentant le rendement énergétique des ressources alimentaires, en contribuant à la reprogrammation génétique du colon et en perturbant les sécrétions endocrines des cellules intestinales, en augmentant la perméabilité intestinale et induisant des réponses pro-inflammatoires du système immunitaire de l'hôte (figure 23).

L'administration d'un traitement antibiotique à des souris obèses permet de réduire le LPS circulant et caecal et est associé à une baisse de l'intolérance au glucose, de la prise de poids et une réduction de l'inflammation, du stress oxydant et de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux[234]. Chez les patients obèses, la proportion de bifidobactéries est significativement diminuée[235]. Or la diminution de cette bactérie est également associée à une augmentation du LPS circulant ainsi qu'au développement de la résistance à l'insuline qui peut être atténuée par l'administration de la bactérie en probiotique[236]. En effet plusieurs études démontrent l'effet bénéfique des bifidobactéries sur l'expression des protéines des jonctions serrées[131,237–239] et leur potentiel d'utilisation comme probiotiques.

Un certain nombre de souches probiotiques ont été étudiées pour leurs effets anti-obésité, notamment parmi le genre *Lactobacillus* spp. Plusieurs souches de *L. rhamnosus* (PL60, LGG ou NCDC 17), *L. plantarum* (Q180, DK211, LG42, TN8, Ln4 et LP14), *L. gasseri*, et *L. paracasei* ont démontré une activité protectrice sur l'accumulation de lipide chez des souris nourries en régime sur-gras[240]. *Akkermansia*

*muciniphila* est également une bactérie qui a souvent été négativement corrélée à l'obésité et semble jouer un rôle de régulation de l'endotoxémie métabolique, le gain de poids, l'inflammation des tissus et le développement de l'insulino-résistance dans le modèle murin[241]. Les propriétés d'*Akkermansia muciniphila* semblent être dérivée de ses métabolites, en effet, l'administration de vésicules extra-cellulaires tirées de ces bactéries ont en elles-mêmes un effet positif sur la prise de poids et la dyslipidémie de souris nourries en régime sur-gras[242]. La bactérie pasteurisée semble également être efficace ce qui en ferait un traitement potentiel sûr[243].

La transplantation fécale suscite elle aussi l'intérêt de la communauté scientifique et plusieurs études ont montré la transmission à des souris axéniques d'un microbiote obésogène provenant de souris génétiquement sensibles à l'obésité[244]. Cependant l'implémentation de ce type de traitement pour traiter l'obésité est assez peu envisageable compte tenu du manque crucial de connaissances et de maîtrise sur la composition du microbiote des donneurs potentiels. Après plus de 60 ans d'existence[245], la FMT reste un traitement de dernier recours dans le traitement des infections à *C. difficile* en raison de la méconnaissance des bon critères de sélection des donneurs, de la dose et voie d'administration, de la durée du traitement et le manque de maîtrise des effets secondaires possibles - notamment les risques infectieux. La FMT n'est à ce jour préconisée pour aucune autre maladie malgré quelques résultats encourageant dans le traitement de la RCH[122].

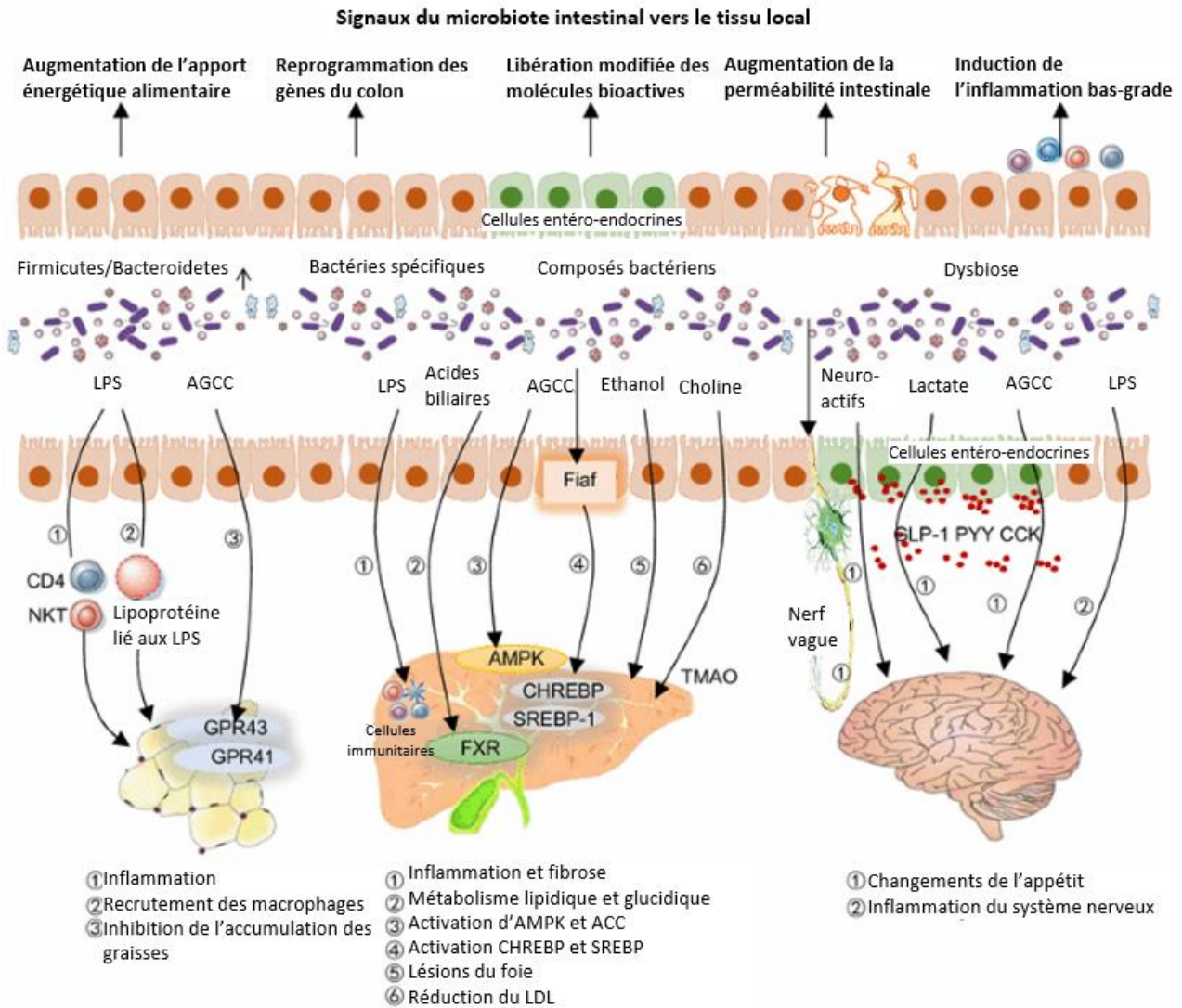


Figure 23. Impact du microbiote intestinal sur des organes distants et sa contribution au développement de l'obésité et du syndrome métabolique (traduit d'après Lijuan Sun, et al. 2018). Le microbiote associé à l'obésité a une capacité accrue à l'exploitation énergétique des ressources alimentaires, contribuent à la reprogrammation génétique du métabolisme dans le colon, changent la sécrétion en hormones polypeptidiques des cellules entéroendocrines, affaiblissent la barrière intestinale et perturbent le système immunitaire. Il peut également impacter des organes distants comme les tissus adipeux, le foie et le cerveau. Le LPS induit des réponses pro-inflammatoires des tissus adipeux et du foie. Les AGCC participent à l'accumulation de graisses dans les adipocytes par l'activation des récepteurs GPR41 et GPR43 qui inhibent la lipolyse et encourage la différenciation des adipocytes. Certains métabolites de la bile, les AGCC et le TMAO jouent également un rôle dans le développement de la maladie du foie gras. Enfin le microbiote intestinal impacte les neurones afférents de l'intestin et l'expression des hormones intestinales et peut ainsi jouer sur le comportement alimentaire.

## I.2.D) Les modèles expérimentaux d'obésité

### I.2.D.a) Les modèles monogénétiques

Il existe plusieurs modèles d'obésité. Les modèles génétiques de souris développant l'obésité de façon spontanée comme *ob/ob* et *db/db* reposent respectivement sur une mutation dans la sécrétion (gène *Lep*) et la réponse (gène *Lepr*) à la leptine (hormone de la satiété et régulatrice des réserves de graisses) leur donnant un appétit excessif. Ces deux modèles génétiques ont un phénotype quasiment identique lorsqu'ils sont issus de la même souche de souris. Les souris *ob/ob* de la variété C57BL/6J développent également une hyper-insulinémie et une insulino-résistance secondaires à l'obésité. Elles sont infertiles et ont un taux accru de corticostéroïdes dans le sang[246]. Le traitement par de la leptine permet d'éviter les symptômes chez ce modèle.

Les souris *db/db* partagent en grande partie le phénotype des souris *ob/ob*. Une hyper-insulinémie peut être observée dans les premiers mois de la vie des souris et conduit à une mort prématurée des animaux vers 5-8 mois. Cependant les complications rénales et vasculaires généralement associées au diabète chez l'homme n'y sont pas retrouvées, probablement à cause de la mort rapide des animaux qui ne laisse pas le temps à ces symptômes de se développer[246].

D'autres modèles monogéniques également impliqués dans la voie de la satiété existent comme les souris *s/s* portant une mutation du facteur de transcription STAT3 qui intervient dans l'activation du récepteur de la leptine ou encore des modèles impliquant un déficit à l'aval du récepteur de la leptine[247]. Ces modèles monogéniques sont couramment utilisés pour l'étude de traitements contre l'obésité. Cependant, en conditions réelles l'obésité ne peut pas être réduite au fait d'un seul gène.

### I.2.D.b) Les régimes sur-gras

Une multitude de régimes induisant une alimentation sur-calorique sont régulièrement utilisés dans l'étude de l'obésité. Contrairement aux modèles monogéniques, ils peuvent être utilisés pour se rapprocher au plus près du développement de l'obésité chez l'être humain. Dans cette approche, les animaux sont nourris *ad libitum* et la prise de poids est corrélée à une augmentation de la consommation en kcal certes liée à la plus grande valeur énergétique des régimes sur-gras par rapport aux régimes contrôle mais aussi à l'activation des circuits de récompense en conséquence à la consommation d'aliments plus « succulents »[248,249].

Le régime normal d'une souris doit contenir environ 10% de matière grasse (en kcal). La plupart des fournisseurs de nourriture pour animaux de laboratoire proposent des régimes sur-gras contenant 45% ou 60% de matière grasse. Le régime à 60% induit naturellement l'obésité de façon bien plus rapide et

permet donc de réduire les coûts. Cependant le régime « occidental » contient typiquement entre 30% et 40% de matière grasse[250,251].

En 2019 le conseil de l'*International Journal of Obesity* s'est réuni pour débattre des doutes émis sur la validité des résultats obtenus avec les régimes à 60% de matière grasse, certains craignant que ceux-ci entraînent une réponse métabolique exagérée des animaux ou que la moindre quantité de sucrose dans les régime 60% par rapport aux régimes 45% pourrait avoir des conséquences sur les observations vu l'importance de la consommation de sucre dans le développement du syndrome métabolique[252]. Ils notent qu'en réponse à cette dernière interrogation de nombreux chercheurs adaptent la quantité de sucrose de leurs régimes contrôles pour correspondre à celle de leur régime expérimental et que les différences métaboliques entre les souris nourries à 45 et 60% de graisse ne sont pas suffisantes pour totalement invalider les recherches[252].

La source de graisse de ces régimes peut grandement varier et doit être prise en compte dans l'élaboration du protocole. Les graisses utilisées pour ces formulations sont tirées d'ingrédients divers comme le beurre, la graisse animale, l'huile de poisson et différentes huiles végétales comme le colza, le maïs, l'huile de coco, le soja, l'olive, la cacahuète, le beurre de cacao, et bien d'autres[253]. En fonction du type de graisse la composition finale en acides gras saturés, polyinsaturés, monoinsaturés et en oméga-3 et 6 va grandement varier, ainsi que leurs conséquences sur la santé. Il est difficile de définir un régime sur-gras « idéal » et la grande variété de formules disponibles se traduit par une grande variabilité entre les études[254]. Par exemple l'huile de palme induit une plus forte expression d'IL-6 dans le plasma sanguin et une plus forte expression d'IL-1 $\beta$ , TLR4 et CD14 dans le tissus adipeux par rapport à l'huile de colza, l'huile de tournesol ou le beurre[255].

En général les régimes sur-gras faits à partir de graisses animales comme le beurre, le lard ou une autre source importante d'acides gras saturés conduisent à une prise de poids et une stéatose hépatique plus prononcées par rapport aux régimes sur-gras principalement composés d'huiles végétales ou d'huile de poisson[256–259].

### I.3) Conclusion : L'inflammation de l'intestin et la dysbiose

Le mode de vie urbain moderne conduit à un déséquilibre de l'alimentation et à un changement de composition du microbiote intestinal. Sa diversité est réduite ce qui fait disparaître les populations bénéfiques en faveur de bactéries pathogènes. Ce changement de composition impacte également le métabolisme des nutriments et fait perdre au système immunitaire de l'hôte sa tolérance pour les bactéries commensales. L'inflammation chronique associée à la dysbiose entretient de nombreux dysfonctionnements immunitaires et métaboliques dans un cercle vicieux. Ainsi, la prévalence des maladies inflammatoires de l'intestin, de l'insulinorésistance et des maladies cardiovasculaires associées ne cesse d'augmenter dans un monde qui adopte de plus en plus le mode de vie urbain.

Dans ce contexte il est important d'évaluer la relation entre microbiote intestinal et pathogénèse de ces maladies. Certaines familles comme *Enterobacteriaceae* et genres bactériens comme *Desulfovibrio* ou *Fusobacterium* sont fortement associés à certaines formes de MICI. Bien que les mécanismes d'action ne soient pas encore complètement élucidés, des études descriptives peuvent servir de base au développement de nouvelles méthodes diagnostiques. De plus le microbiote intestinal peut vraisemblablement avoir un impact sur la réponse au médicament des patients en modifiant la structure de la molécule thérapeutique par activité enzymatique et altérer ainsi sa biodisponibilité, son activité ou sa toxicité[260].

De nombreuses études de populations basées sur les techniques de séquençage de nouvelle génération tentent d'évaluer avec l'impact de la génétique et de différents facteurs environnementaux sur la population du microbiote intestinal. Cependant le grand nombre d'espèce à évaluer et le manque de puissance du 16S, technique la plus largement utilisée pour l'étude du microbiote, rend difficile la compréhension de l'impact de chaque espèce sur les maladies et vice versa. Il reste encore de nombreuses zones noires à explorer dans notre compréhension des interactions entre le microbiote intestinal et son hôte et entre les bactéries du microbiote intestinal elles-mêmes. Parmi les acteurs de la régulation du microbiote intestinal, on trouve la production de peptides antimicrobiens par le système immunitaire inné.

## II. Les peptides antimicrobiens comme traitements anti-inflammatoires

Le système immunitaire inné joue un rôle important dans l'initiation de la réponse inflammatoire. Les peptides antimicrobiens (défensines, cathélicidines, etc.) sont des molécules du système immunitaire inné avec de nombreux modes d'actions. Ils peuvent agir comme antibiotiques à large spectre mais également jouer un rôle immunorégulateur en activant des cascades d'induction de gènes (des chémokines par exemple) ou en régulant le recrutement du système immunitaire adaptatif. Les PAMs ont un rôle crucial dans la régulation et la réponse du système immunitaire contre les pathogènes. Ils sont actuellement étudiés comme alternative aux antibiotiques classiques dans la lutte contre les bactéries multi-résistantes.

### II.1) Définition et classification des peptides antimicrobiens

#### II.1.A) Structure générale des PAMs

Les PAMs sont de petites molécules généralement entre 12 et 50 acides aminées. Ils sont produits par la plupart des espèces vivantes comme moyen de défense contre des micro-organismes pathogènes. Ils sont principalement exprimés aux surfaces épithéliales et les protègent contre les agents infectieux. Leurs modes d'action sont variés et multiples. En plus d'une activité antimicrobienne, ils peuvent avoir des propriétés immunorégulatrices, promouvoir la croissance ou la réparation des tissus. Les PAMs sont très variés par leur origine, leur séquence et leur structure.

Les PAMs décrits ci-dessous sont les plus étudiés en relation à la santé du tractus gastro-intestinal. Leur structure générale est résumée en figure 24.

#### II.1.B) Les différentes classes de peptides antimicrobiens

Il existe plusieurs façons de classer les PAMs : leur provenance (bactérienne, fongique, animale...), leur activité (antibactérienne, antifongique, antivirale...), leur richesse en acides aminées spécifiques ou leur structure secondaire [261]. Chez les mammifères, les PAMs sont produits dans les tissus exposés tels que la peau et les muqueuses. Dans les familles les plus connues de PAMs impliquées dans la santé du tractus gastro-intestinal on retrouve les défensines, les cathélicidines, les histatines ou les lectines de type C de la famille REG3.

##### II.1.B.a) Les défensines

Les défensines sont fortement impliquées dans l'immunité innée et sont divisées en 3 groupes : les  $\alpha$ -défensines, les  $\beta$ -défensines et les  $\theta$ -défensines. Seules les deux premières sont présentes chez l'homme.

Les  $\alpha$ -défensines font entre 29 et 50 aa. Il en existe 6 types chez l'homme. Les HNP1 à 4 (Human Neutrophil Peptides) sont produites et stockées par les cellules du système immunitaire et utilisées pendant la phagocytose. Les human  $\alpha$ -defensins 5 et 6 (HD-5 et HD-6) sont secrétées par les cellules de Paneth de l'épithélium intestinal et les cellules épithéliales du tractus uro-génital de la femme[262]. HD-5 et HD-6 sont très impliquées dans l'homéostasie de l'intestin et le maintien du microbiote intestinal. Leur expression est abaissée chez les patients de la maladie de Crohn avec atteinte iléale et HD-5 a été proposée comme biomarqueur de la maladie[263,264]. Les  $\alpha$ -défensines humaines possèdent des propriétés de neutralisation et d'inactivation de toxines bactériennes en plus de leurs propriétés antimicrobiennes[265–267]. Les  $\beta$ -défensines font entre 41 et 50 aa. Il en existe 17 types chez l'homme. Leur distribution est beaucoup plus large que pour les  $\alpha$ -défensines et on les retrouve dans de très nombreux tissus. HBD-1 (human  $\beta$ -defensin 1) par exemple est constitutive de la muqueuse buccale et gastrique et son expression varie en cas d'infection ou de gastrite[268].

#### II.1.B.b) Les histatines

Les histatines sont une famille de petits peptides riches en histidine. Elles sont notamment présentes de façon constitutive dans la salive humaine où elles exercent une activité bactéricide et fongicide. Les histatines 1, 3 et 5 sont les plus importantes, notamment histatine 5 dont l'activité est la plus forte. L'activité fongicide de l'histatine 5 a été très étudiée, notamment contre *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*. Elles jouent un rôle majeur dans la santé buccale en limitant les infections[262,269].

#### II.1.B.c) Les cathélicidines

Les cathélicidines sont une famille de PAMs cationiques qu'on retrouve chez un grand nombre d'espèces animales, vertébrées comme invertébrées. Elles jouent un rôle dans l'inflammation et la réparation des tissus, influencent la composition du microbiote intestinal et elles ont montré des propriétés protectrices contre la colite induite chez la souris. Chez l'homme, le seul peptide de cette famille à avoir été découvert est la LL-37 (mCRAMP est son homologue murin). Les peptides générés par les gènes de la cathélicidine sont extrêmement différents d'une espèce à l'autre et sont regroupés en un groupe en raison de la similarité de leur précurseur principalement constitué d'un large domaine N-terminal hautement conservé appelé domaine cathéline. Le domaine C-terminal est hautement variable inter et intra-espèce et c'est lui qui sera clivé pour donner le peptide antimicrobien mature[270].

hCAP18 (poids moléculaire de 18kDa), le précurseur de LL37, est produit et stockée dans les granules des neutrophiles où elle peut atteindre une concentration de 40 $\mu$ M. Elle est également produite pas les mastocytes et les cellules NK ainsi que les cellules épithéliales de la peau, des poumons, des glandes



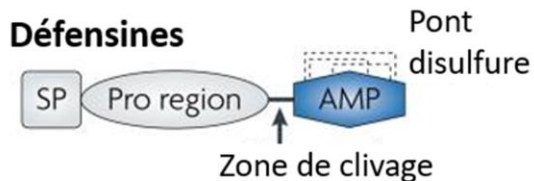
mammaires ou de l'intestin. Une fois LL37 clivée du domaine C-terminal de hCAP18 par la protéinase 3 des neutrophiles (ou d'autres protéases en fonction du tissu), elle possède un puissant effet antimicrobien à large spectre[270]. Une fois clivée LL37 est un peptide de 37 acides aminés riche en lysine et en arginine ayant une structure en hélice  $\alpha$ [271].

#### II.1.B.d) Les lectines de type-C de la famille Reg3

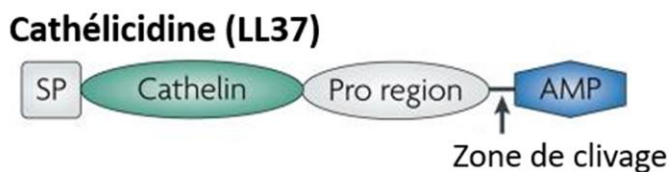
Les regenerating islet-derived (Reg) proteins font partie de la superfamille des lectines de type-C qui comprend plus de 1000 protéines. Il existe 4 sous-groupe dans la famille des Reg (REG chez l'humain) : Reg1, Reg2 (qui n'a pas d'orthologue humain), Reg3 et Reg4. Elles sont composées d'un domaine lectine de type-C impliqué dans la reconnaissance d'oligosaccharides (en nécessitant du calcium pour effectuer la liaison) et d'un domaine de signalisation N-terminal.

Les Reg ont des propriétés promotrices de la prolifération, différenciation et anti-apoptotiques chez plusieurs types cellulaires dans différents contextes. Elles sont principalement sécrétées par le pancréas et l'épithélium intestinal.

#### a Protéines cationiques ou peptides



Les ponts disulfure confèrent une structure macrocyclique aux peptides



#### b Protéines se liant au peptidoglycane

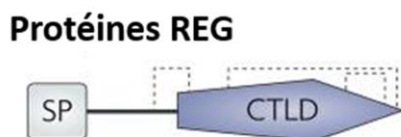


Figure 24. Structure et domaines de fonction de quelques peptides antimicrobiens impliqués dans l'homéostasie intestinale. (traduit d'après Jay K. Kolls, Paul B. McCray, Jr, et Yvonne R. Chan, 2008). SP = signal peptide, AMP = antimicrobial peptide, CTLD = C-type lectin domain

Parmi elles, le groupe Reg3 et particulièrement la REG3A humaine et les Reg3 $\beta$  et Reg3 $\gamma$  murines (175, 175 et 174aa[272], 138aa une fois clivée), sont très étudiées pour leurs propriétés antimicrobiennes et leur contribution à la régulation du microbiote intestinal. Elles ont un poids moléculaire d'environ 16kDa et possèdent un site actif EPN (acide glutamique, proline, asparagine) leur permettant de reconnaître et se lier au PGN des bactéries gram positives indépendamment du calcium[273].

### II.1.C) Expression, induction et activation des PAMs

L'expression constitutive des PAMs varie en fonction du stade de développement de l'individu. Ainsi mCRAMP est fortement exprimée dans l'intestin grêle néonatal de la souris alors qu'il ne l'est pas chez l'adulte ce qui permet de protéger le nouveau-né contre les infections et de réguler la colonisation du tractus gastro-intestinal par le microbiote[274].

Chez l'adulte, l'expression de nombreuses PAMs est fortement augmentée en cas de blessure ou d'infection. En temps normal, la plupart des PAMs sont stockés à forte concentration sous leur forme précurseur dans les granules intracellulaires. Cela signifie que l'activité des PAMs peut également être régulée en jouant sur l'expression des différentes protéases nécessaires pour les cliver dans leur forme active.

Par exemple HD5, HD6 et les leptines de la famille REG3 sont synthétisées sous forme de propeptide et doivent être clivées par la trypsine (une protéase du système digestif) colocalisée au sein des granules de sécrétion des cellules de Paneth. La cathélicidine humaine doit quant à elle être clivée par la protéinase 3 exprimée dans les granulocytes des neutrophiles[275] (figure 25).

En réponse à la reconnaissance d'un pathogène par les PRRs des CPA, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 induisent la différenciation des lymphocytes Th17. Ceux-ci produisent les cytokines

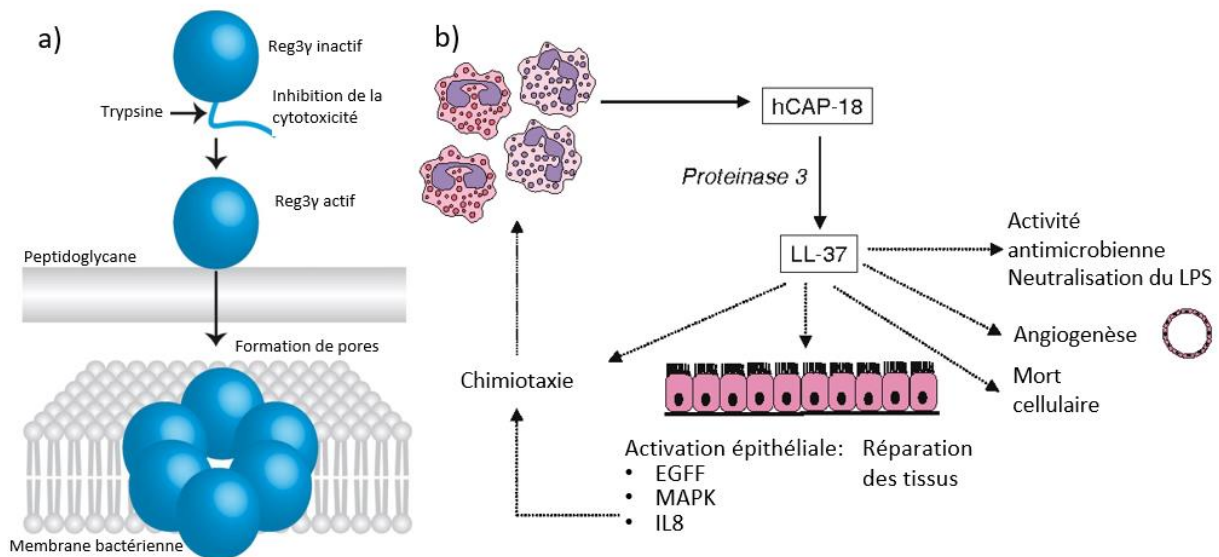


Figure 25. Activation des peptides antimicrobiens à leur sécrétion (traduit d'après Shin JH, Seeley RJ, 2019 et G. Tjabringa, K. Rabe, P. Hiemstra 2005). La plupart des peptides antimicrobiens sont synthétisés sous une forme précurseur inactives et sont clivés en leur forme active par des protéases comme a) la trypsine (défensines ou leptines de la famille des REG3) ou b) la protéinase 3 (LL-37).

IL-17 et IL-22 qui vont à leur tour induire l'expression des peptides antimicrobiens par l'épithélium mais également de chémokines qui interviennent dans le recrutement des neutrophiles[276,277] (figure 26) (à noter que les PAMs eux-mêmes peuvent être impliquées dans le recrutement du système immunitaire, cf II.2.B). IL-22 est notamment nécessaire à l'expression des leptines de type-C de la famille REG3[276]. Ainsi des souris déficientes en IL-22 sont particulièrement sensibles aux infections par *C. rodentium*, ce qui est atténué par l'administration d'un REG3 $\gamma$  recombinant ou de Reg3 $\gamma$ [278].

L'expression de la cathélicidine humaine repose moins directement sur l'induction par les TLRs et en partie sur la modulation de la vitamine D[279–281] et l'acétylation des histones[282,283]. Ainsi le butyrate, un inhibiteur de l'histone désacétylase, stimule la production de cathélicidine dans les cellules intestinales[283]. De même la supplémentation en vitamines D chez des patients atteints de MC en rémission est associée à une augmentation de l'expression de LL37, le maintien de la barrière intestinale et une meilleure qualité de vie[284].

Les conditions de vie peuvent impacter la production de PAMs par le corps et le rendre plus sensible aux infections. Par exemple, dans le modèle murin, l'expression de la cathélicidine et de la  $\beta$ -défensine 3 est inhibée par les glucocorticoïdes administrés par voie topique ou produits de façon endogène notamment en cas de stress psychologique ce qui peut aggraver les infections cutanées[285]. Le stress réduit également la production d' $\alpha$ -défensine par les cellules de Paneth et provoque une dysbiose qui est atténuée par l'administration de cryptdin-4 (une  $\alpha$ -défensine murine)[286].

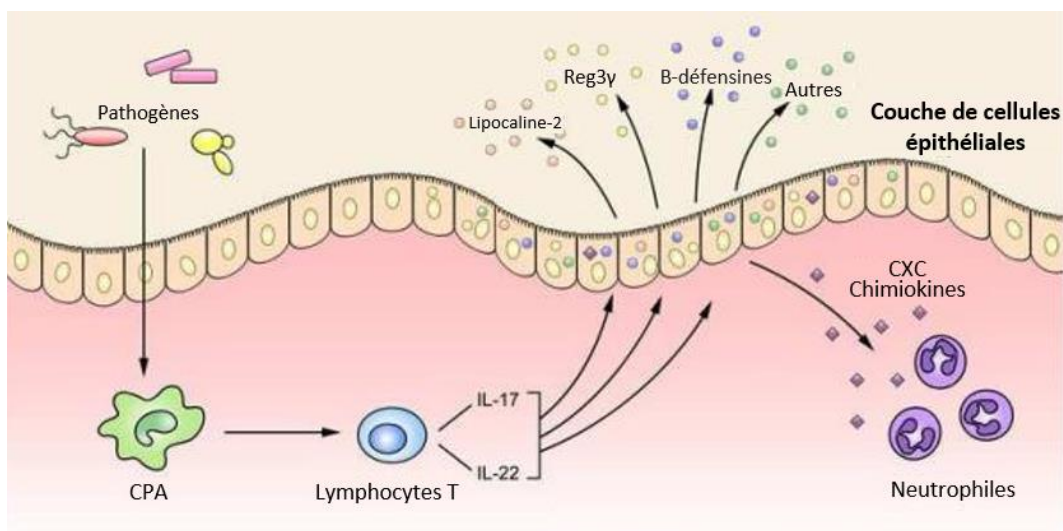


Figure 26. Induction de l'expression de peptides antimicrobiens à la surface d'un épithélium (adapté de Janet Z. Liu, Milad Pezeshki, et Manuela Raffatellu). Lorsque des pathogènes sont détectés par le système immunitaire, les cytokines IL-17 et IL-22 sont exprimées par les lymphocytes T et vont induire l'expression de divers peptides antimicrobiens par les cellules de la barrière épithéliale. APC = cellules présentatrices d'antigènes.

## II.2) Les fonctions physiologiques des peptides antimicrobiens

### II.2.A) Protection de la barrière intestinale contre les infections

Les PAMs sont des régulateurs clé de la composition du microbiote intestinal et de ses interactions avec l'hôte. Dans l'intestin, les cellules de Paneth sont les principaux producteurs. Avec les mucines, ils jouent un rôle critique dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale. La concentration en PAMs varie en fonction de la localisation dans le tube digestif et influence la composition locale du microbiote (cf. figure 11, I.1.D.a).

Les concentrations que les PAMs doivent atteindre *in vitro* pour tuer les bactéries sont souvent bien plus élevées que les concentrations retrouvées dans la lumière intestinale *in vivo*. Par exemple la concentration inhibitrice minimale de LL37 sur *E.coli* est de 32 µg/mL alors que sa concentration au niveau de la muqueuse est de 2 µg/mL[271]. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer cela. Par exemple LL37, les HBD, le lysozyme (protéine enzymatique lysant le PGN) et la lactoferrine (glycoprotéine

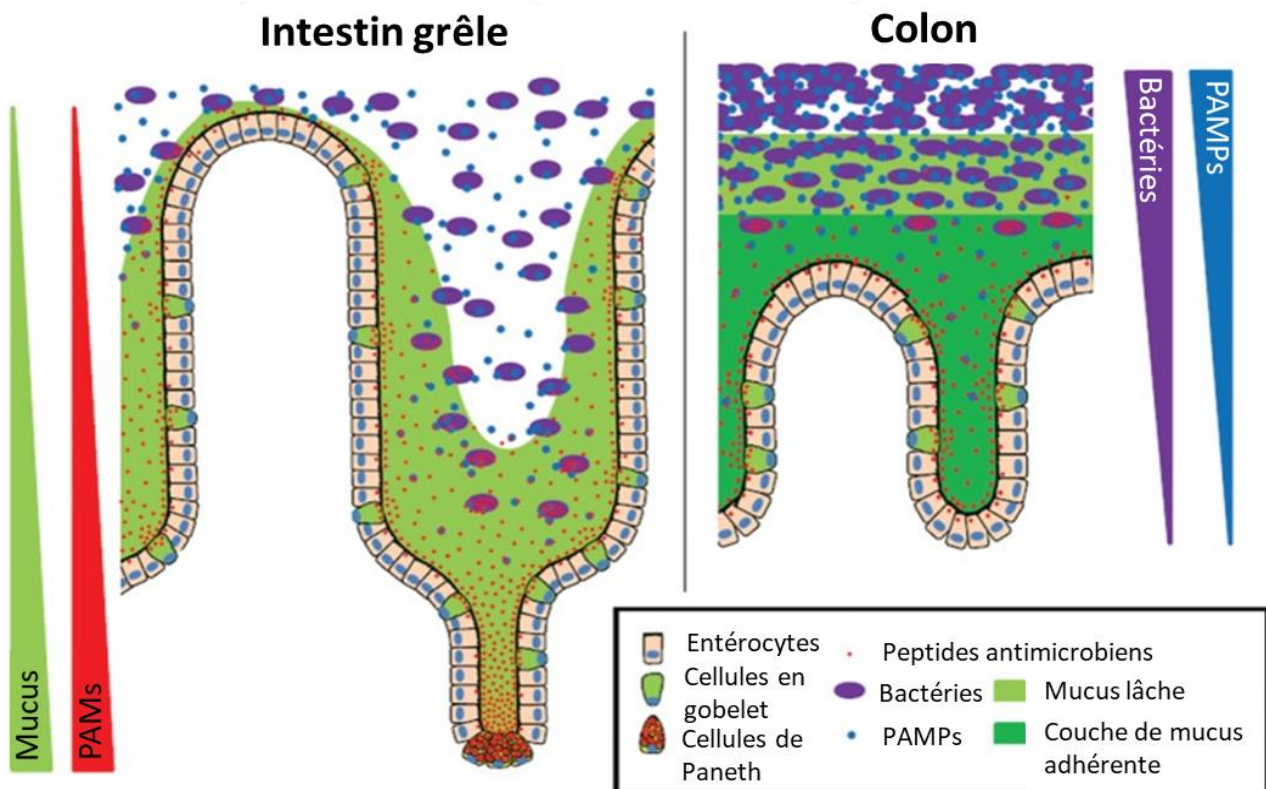


Figure 27. Propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires de la couche de mucus (figure traduite de Aline Dupont et al. 2014). Dans l'intestin grêle les cellules de Paneth produisent les peptides antimicrobiens et génèrent un gradient de concentration de la surface cellulaire à la lumière intestinale empêchant les bactéries de pénétrer au plus profond de la couche de mucus. Ce gradient existe aussi dans le colon où en plus la couche de mucus interne forme un réseau très dense qui constitue une barrière physique empêchant la pénétration des bactéries.

antimicrobienne et régulatrice de l'immunité) agissent en synergie pour tuer leurs cibles plus efficacement[287,288]. De plus, en cas d'inflammation, les PAMs s'accumulent pour atteindre des concentrations locales bien plus élevées qu'habituellement. Ainsi l'expression des défensines est stimulée par l'infection des cryptes intestinales par *E. coli* ou *S. aureus in vitro*[289].

A leur sécrétion, les PAMs peuvent atteindre une concentration locale de 100mg/mL[290]. Ils ne diffusent pas dans la lumière intestinale mais restent attachés aux mucines et génèrent un gradient de concentration empêchant la pénétration des bactéries dans l'épithélium de l'intestin grêle (figure 27). Une petite zone d'environ 50µm sépare la surface de l'épithélium des bactéries intestinales[291].

La réponse du système immunitaire inné et la production de PAMs jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Ainsi un déficit en PAMs se traduit en une augmentation du risque d'infections par des pathogènes tels que *Yersinia pseudotuberculosis*, *Acinetobacter baumannii*, et *Pseudomonas aeruginosa*[292]. Cette susceptibilité aux infections et à l'inflammation se retrouve dans les modèles animaux déficients en cellules de Paneth[290]. On retrouve une différence dans la production gastro-intestinale de PAMs entre les patients atteints de MICI et les personnes saines qui varie en fonction de l'atteinte et de la maladie[293].

#### II.2.A.a) Les défensines

Certaines mutation génétiques –sur le gène *NOD2*[294,295] (gène d'expression d'un PRR) ou le gène *XBP1*[296] (facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique) par exemple- sont liés à une déficience des cellules de Paneth et une forte réduction de la production de HD5 associée à une plus grande susceptibilité à des formes sévères de la MC[297]. Chez la souris, une baisse en Autophagy Related 16 like 1 (ATG16L1) conduit à la baisse de la sécrétion des défensines dans le lumen par les cellules de Paneth et le développement d'une iléite[298]. De manière générale l'expression de HD5 est significativement réduite chez les patients atteints de la forme iléale de la MC[263]. HD5 agit principalement en perturbant les membranes bactériennes mais certaines études suggèrent qu'elle peut le faire par des mécanismes intracellulaires. En effet elle s'accumule dans les *E. coli* qui y sont exposées et qui subissent des modifications morphologiques comme l'élongation ou l'agglutination[299]. HD6 agit quant à lui en s'assemblant en fibrilles emprisonnant les bactéries et empêchant leur pénétration dans les cryptes intestinales[300].

#### II.2.A.b) hCAP18/LL37

LL37 possède des propriétés antibactériennes reposant sur sa capacité de perturbation de la membrane par la formation de pores[301]. On en a retrouvé dans les pièges extracellulaires des neutrophiles[302].

Elle est produite à la surface de nombreux épithéliums où elle aide à combattre les infections par des pathogènes. Elle est exprimée de façon constitutive mais peut également être induite. Dans les intestins, son expression peut être stimulée par les AGCC[303]. Les cathélicidines humaine et murines tuent les *Escherichia coli* O157:H7 entérohémorragiques *in vitro* et les souris déficientes en mCRAMP sont plus susceptibles à l'infection par ces bactéries[304] et à la colite induite par l'infection à *C. difficile*[305]. Les souris wild-type élevées en cohabitation avec les souris mCRAMP<sup>-/-</sup> développent un microbiote intestinal proche de ces dernières et une plus grande susceptibilité à la colite induite au DSS[306], suggérant que la modulation du microbiote par LL-37 joue un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie des intestins.

### II.2.A.c) Les peptides REG3

Il existe 4 peptides de cette famille chez la souris : Reg3 $\alpha$ , Reg3 $\beta$ , Reg3 $\delta$ , et Reg3 $\gamma$ . Chez les humains seules REG3A (également appelée REG3 $\beta$  et HIP/PAP) et REG3 $\gamma$  existent[307,308]. Les peptides de la famille REG3 sont produits notamment par le pancréas mais aussi par les cellules de Paneth et les entérocytes en cas d'activation des TLRs[309] lors d'une infection ou d'un événement inflammatoire et leur expression est régulée par IL22[310]. Chez la souris l'expression de REG3 $\gamma$  est coréglée avec celle de REG3 $\beta$ [292].

La composition initiale du microbiote intestinal est cruciale dans la réponse de l'hôte à l'inflammation et la production de REG3. En effet des souris traitées au métronidazole ont une diminution de l'abondance en *Turicibacteraceae*, une surabondance en *E. coli* et une expression augmentée des ARNm de REG3 $\beta$  et REG3 $\gamma$ [311]. Les souris conventionnelles ont une expression en ARNm de REG3 $\gamma$  31 fois supérieure à celle des souris axéniques. De plus les souris axéniques voient l'expression de REG3 $\gamma$  augmenter de 20 fois après colonisation par un microbiote issu de souris conventionnelles[312].

REG3 $\gamma$  est nécessaire au maintien de la zone séparant l'épithélium du microbiote. En effet les souris REG3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> ont une perte de la séparation surface de l'épithélium/bactéries intestinale (figure 28) couplée à une colonisation plus importante de l'intestin par les bactéries et une suractivation de la réponse du système immunitaire adaptatif. Un traitement par antibiotiques permet de réduire la quantité d'immunoglobulines A fécale et la réponse Th1 de ces souris[291]. L'effet de REG3 $\gamma$  sur l'immunité serait donc une conséquence indirecte liée à sa capacité de contrôle du microbiote intestinal. L'expression entérique de REG3A chez des souris transgéniques permet de réduire les symptômes de la colite induite par le DSS et le TNBS et altère la composition du microbiote intestinal. De plus le transfert du microbiote de souris exprimant REG3A à des souris conventionnelles les protège de la colite induite[313].

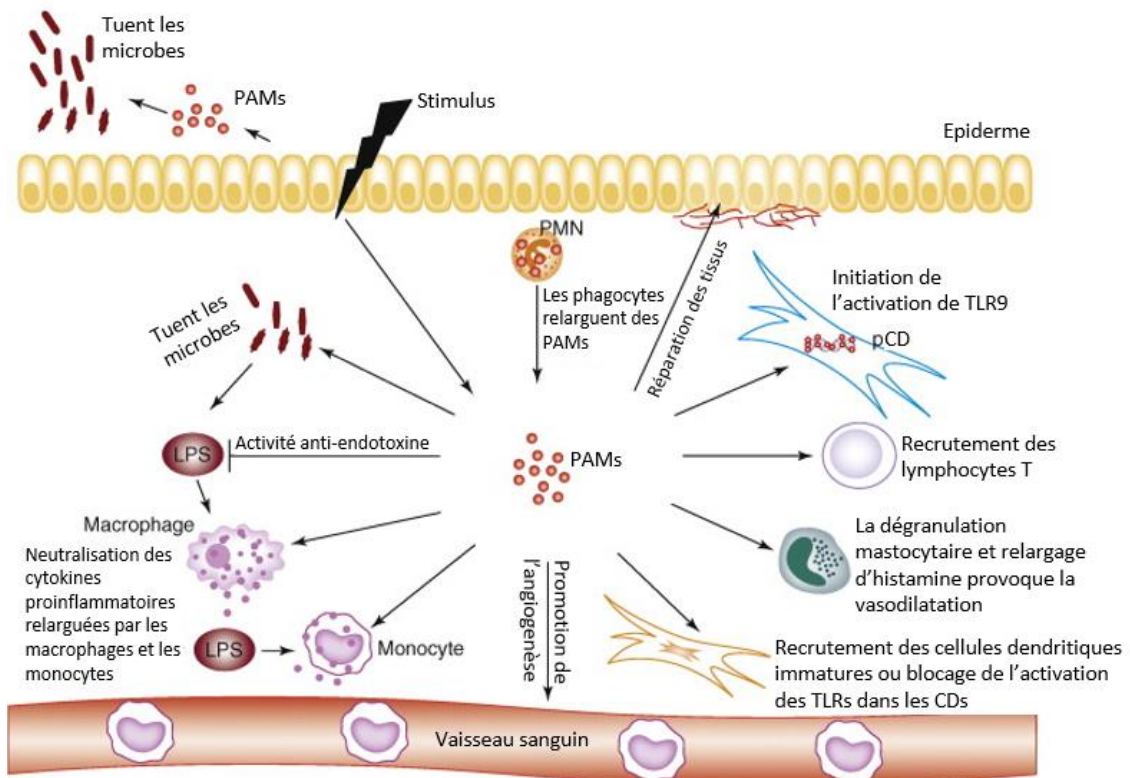


Figure 28. Les fonctions multiples des peptides antimicrobiens (traduit de Yuping Lai et Richard L.Gallo, 2009). Les PAMs peuvent induire une grande variété de réponses chez les cellules du système immunitaire inné comme les monocytes, macrophages, neutrophiles et les cellules épithéliales. Ils peuvent modifier l'expression des gènes de l'hôte en induisant la production de cytokines et chimiokines, en promouvant le recrutement des leucocytes vers le lieu de l'infection, et en promouvant la différenciation des cellules du système immunitaire adaptatif en participant à l'initiation de la réponse au signal des TLR. AMPs induce a variety of responses in host innate immune cells such as monocytes, macrophages, neutrophils and epithelial cells. Abréviations : PAMs, peptides antimicrobiens; CD, cellules dendritiques; LPS, lipopolysaccharide; pCD, Cellules dendritiques plasmacytoïdes; PMN, polymorphonucleocyte; TLR, Toll-like receptor.

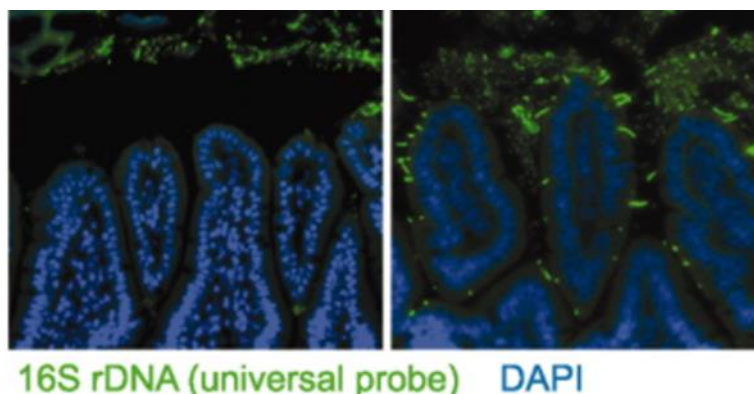


Figure 29. Hybridation in situ en fluorescence de souris wild-type et  $Reg3\gamma^{-/-}$  avec un marqueur universel bactérien 16S (en vert) (Shipra Vaishnava et al. 2011).



## II.2.B) Peptides antimicrobiens et modulation du système immunitaire

Il apparaît que de nombreux peptides antimicrobiens ne sont pas de simples antibiotiques mais possèdent également des propriétés immunomodulatrices directes. Ils peuvent ainsi altérer l'expression des gènes de l'hôte, servir de signal pro-inflammatoire et induire la production de chémokines, inhiber les voies de signalisation induites par le LPS ou moduler la réponse immunitaire adaptative (figure 29).

En effet, HNP-1 induit la migration des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ainsi que des cellules dendritiques immatures[314] et des monocytes[315]. Des propriétés similaires sont également retrouvées chez les HBD[315–317]. De même, LL37 est capable de mobiliser les monocytes, neutrophiles et les lymphocytes T via le récepteur formyl peptide 1[318]. D'autres propriétés immunomodulatrices sont associées à ce peptide. Elle induirait l'expression des chémokines CXCL8 et CCL2 par les macrophages et le relargage de l'histamine et des prostaglandines par les mastocytes[319]. LL37 induirait également l'expression et la distribution des TLRs à la surface des mastocytes ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène[320]. Elle a paradoxalement un rôle inhibiteur à la réponse au TLR4 en inhibant l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, et IL-8) induite par le LPS chez les monocytes[321]. Plusieurs modèles ont été proposés pour en expliquer le mécanisme. Par exemple LL37 se lierait au LPS pour empêcher son interaction avec TLR4[271].

## II.2.C) Peptides antimicrobiens et réparation des tissus

La réparation des tissus se divise en quatre phases s'entre-chevauchant : la coagulation, l'inflammation, la prolifération cellulaire et la cicatrisation. L'échec du bon déroulement de ces mécanismes résulte en une plaie chronique. Chez les patients atteints de MICI on retrouve de nombreuses atteintes des muqueuses mais également de la peau qui deviennent plus sensibles aux infections[322].

L'application de LL37 induit la prolifération et la formation de structures similaires aux vaisseaux sanguins *in vitro* et une revascularisation dans le modèle lapin tandis que chez la souris, les animaux déficients en mCRAMP ont une moins bonne vascularisation pendant le processus de réparation des tissus, témoignant du rôle de la cathélicidine dans l'angiogenèse[323]. Elle est exprimée par la peau en processus de réparation dans des modèles *ex vivo*. De plus la réépithélialisation est inhibée de manière dose dépendante par l'application d'anticorps dirigés contre la LL37[324]. Une baisse de l'expression de LL37 contribuerait donc au maintien de blessures chroniques de la peau. Celle-ci a par ailleurs été testée avec succès comme traitement topique sur des patients souffrant d'ulcère veineux[325]. On peut supposer que des mécanismes similaires existent au niveau de la barrière intestinale.

D'autres peptides antimicrobiens pourraient également être intéressants. HNP1 et HBD2 stimulent la prolifération des fibroblastes du tissu conjonctif humain[326]. REG3A régule la prolifération et la différenciation des kératinocytes après une blessure de la peau[327,328]. Par ailleurs, l'hyperglycémie inhibe l'expression de REG3A par l'épiderme cutanée et exacerbe l'inflammation des blessures chez les patients diabétiques[329].

#### II.2.D) PAMs et maladies inflammatoires de l'intestin

Chez les patients atteints de MICI, l'expression des PAMs est dérégulée. De nombreuses études montrent l'importance des PAMs dans le contrôle de ces maladies. Une réduction de l'expression de HD5 et HD6 est associée au développement des lésions iléales chez les patients atteints de MC mais pas aux lésions du colon de la MC ni à la RCH[263,330]. Le rôle des cellules de Paneth semble donc différent entre la MC et la RCH. Dans la RCH elles restent fonctionnelles comme en témoigne l'expression accrue des défensines chez les patients alors que dans la MC leur diminution exacerbe les dommages épithéliaux, particulièrement au niveau de l'iléon[66].

L'expression de LL37 est augmentée chez les patients atteints de RCH mais pas chez ceux atteints de MC. De plus cette expression est localisée dans la partie basale de l'épithélium chez les patients atteints de MICI ce qui n'est pas le cas chez les personnes saines. Cette absence d'induction de la production de cathélicidine dans le tissu en état d'inflammation contribuerait au dysfonctionnement de la barrière épithéliale chez les patients atteints de la MC[293]. Le taux de cathélicidine circulant est corrélé à un meilleur pronostic et peut permettre d'identifier l'état d'activité de la maladie[331].

#### II.2.E) PAMs et maladies métaboliques

De nombreuses études suggèrent un rôle important des PAMs dans le développement du syndrome métabolique et du diabète. Ainsi l'expression de  $\beta$ -défensine par les cellules endocrines du pancréas induite par IL-22 a un rôle préventif dans le développement du diabète auto-immune chez les souris NOD (non obese diabetic)[332]. Le traitement par la cathélicidine a un effet protecteur sur le développement du diabète de type 1 dans le modèle de rat et augmente l'abondance en *Lactobacillus* de leur microbiote fécal[333]. Une étude plus récente a montré que mCRAMP altérait le microbiote intestinal et avait un effet protecteur sur le développement du diabète chez les souris NOD[334].

Dans le modèle murin en régime sur-gras, les changements en composition du microbiote et la diminution de l'expression de Reg3 $\gamma$  par les cellules de Paneth précèdent les changements d'expression des cytokines pro-inflammatoires[335]. Cette altération se fait par la dérégulation de la voie peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )[336], un régulateur du stockage des lipides. On observe

également que les patients diabétiques ayant subi une chirurgie de bypass gastrique ont une augmentation de l'expression de REG3 $\gamma$ [337]. Chez la souris c'est l'expression de Reg3 $\beta$  qui est augmentée[338].

Secq et al. ont observé une surexpression de REG3A chez des patients obèses ainsi qu'un gain de poids chez des souris transgéniques TgPAP/HIP -exprimant REG3A spécifiquement dans les cellules hépatiques- nourries normalement et lui attribuent donc des propriétés obésogènes[339]. Cependant une autre étude montre que la surexpression de REG3 $\gamma$  protège les souris contre l'obésité induite via son influence sur le microbiote intestinal et l'augmentation de l'abondance en *Lactobacillus*[340]. D'autres recherches sont nécessaires pour comprendre le lien entre les Reg3 et l'obésité.

### II.3) Conclusion : Les PAMs comme stratégie thérapeutique de l'inflammation intestinale

Les PAMs sont un arsenal de molécules régulatrices de la barrière intestinale ayant une grande diversité de modes d'action. Ils contribuent à la régulation de la population microbienne par leurs activités bactéricides et bactériostatiques. Leur expression constitutive est nécessaire au maintien de la barrière intestinale. En cas de blessure, l'expression de PAMs est fortement augmentée et permet de prévenir la survenue d'infection. Les PAMs ont une expression réduite chez les patients atteints de formes graves de MICI, contribuant à la dysbiose et au maintien de la barrière intestinale en état d'inflammation constant et altère le processus de réparation des tissus.

Le microbiote intestinal influence l'expression des PAMs par l'hôte. En effet, les souris axéniques voient leur expression en PAMs fortement augmenter après colonisation par le microbiote fécal de souris conventionnelles. Il existe un dialogue PAMs-microbiote et certains métabolites bactériens comme les AGCC sont capables d'induire l'expression de peptides antimicrobien spécifiques. Une bonne compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'atténuer les symptômes de l'inflammation en induisant l'expression de PAMs dirigés contre les pathogènes tout en favorisant les bactéries commensales bénéfiques à l'hôte.

### III. L'utilisation de probiotiques comme vecteur de traitement ciblé au niveau de la barrière intestinale

La hausse des troubles intestinaux et digestifs ainsi que du syndrome métabolique due aux changements alimentaires et environnementaux associés à l'industrialisation mobilise la communauté scientifique à la recherche de traitements efficaces. La dysbiose jouant un rôle critique dans le développement de ces maladies, l'administration de probiotiques pouvant jouer sur la composition du microbiote intestinal a été suggérée comme moyen de remplacer l'utilisation de médicaments classiques.

#### III.1) Historique et définition d'un probiotique

Les probiotiques sont par définition des microorganismes vivants, principalement des bactéries, associées à des bienfaits sur la santé de l'hôte lorsque ingérés en quantité suffisante. La figure 30 résume les différents effets possibles des probiotiques sur la santé de l'hôte[341]. On les retrouve notamment dans les produits laitiers et autres produits fermentés de l'alimentation humaine[342]. Les probiotiques sont souvent séparés en deux catégories : les probiotiques issus de produits alimentaires tels que les

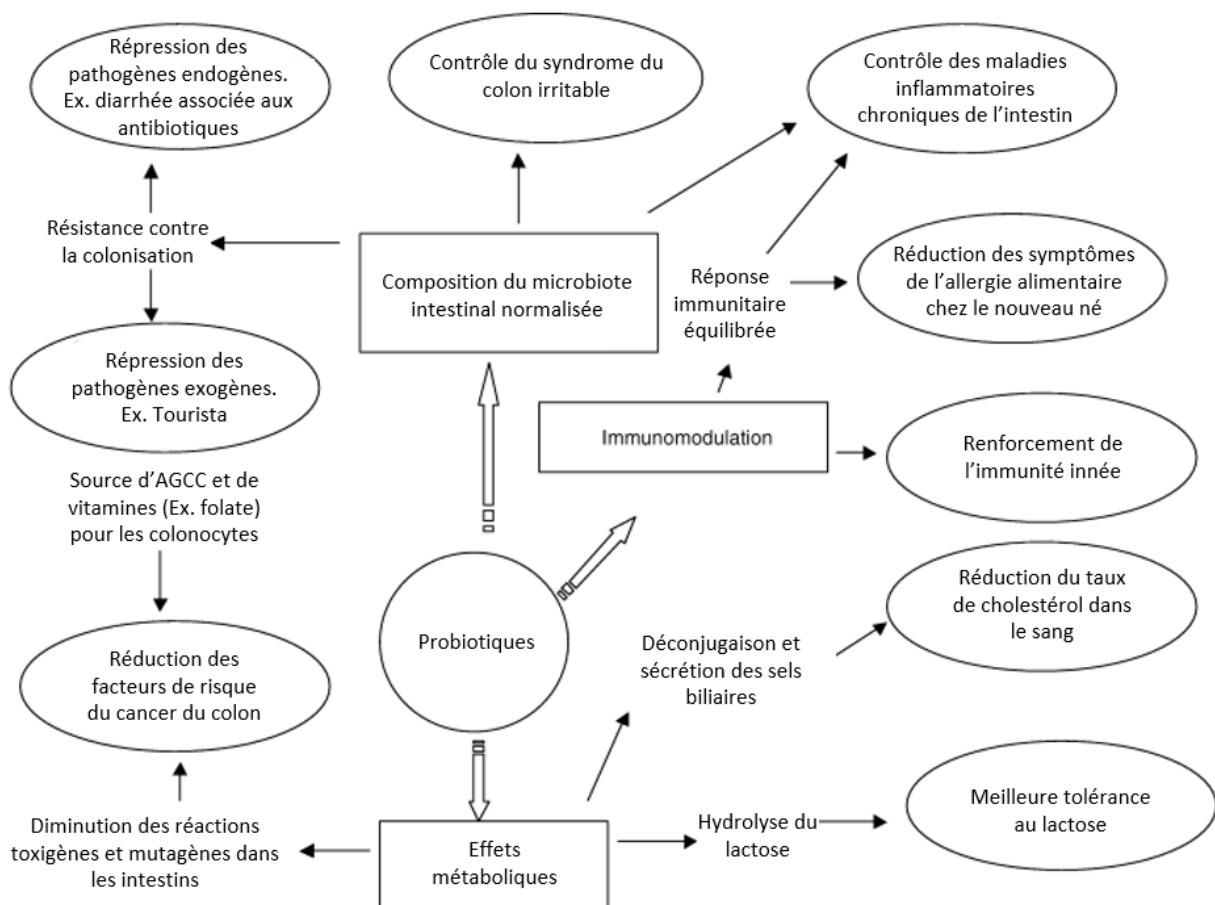


Figure 30. Effets bénéfiques attribués aux probiotiques (traduit d'après S. Parvez et al. 2006).

bactéries lactiques et les probiotiques issus du microbiote humain. Les bactéries lactiques -capables de fermenter les sucres en acide lactique- des genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* sont particulièrement étudiées.

Élie Metchnikoff (1845-1916), un chercheur russe ayant travaillé à l'Institut Pasteur de Paris, a établi l'effet bénéfique de la consommation de yaourts et laits fermentés sur la santé chez des paysans d'Europe de l'Est. Il a reçu le prix Nobel en 1908 pour ses travaux sur le lien entre les bactéries intestinales et le système immunitaire. Au début du 20<sup>e</sup> siècle d'autres chercheurs -comme Léo Rettger- se sont intéressés à l'étude des bactéries lactiques, notamment *Lactobacillus acidophilus*, pour le traitement des troubles intestinaux.

Alfred Nissle a observé que certaines bactéries commensales humaines étaient capables d'inhiber la croissance de *Salmonella*. En 1917 il isole la souche *E. coli* Nissle 1917, ayant une activité antagoniste contre les *Enterobacteriaceae*, à partir des fèces d'un soldat allemand épargné par l'épidémie de shigellose qui touchait sa région d'affectation[343]. Encore aujourd'hui cette souche est distribuée sur le marché pharmaceutique et est parfois prescrite pour le traitement des gastroentérites[344] ou du syndrome du côlon irritable[345]. Cependant les recherches sur les probiotiques sont restées marginales pendant de longues années en raison de l'apparition des traitements antibiotiques et la « guerre contre les microbes » qui relaya toute discussion autour de bactéries bénéfiques en second plan[346].

L'apparition et la généralisation des résistances aux antibiotiques et la crainte grandissante d'une « ère post-antibiotiques » renoue l'intérêt du domaine médical pour les notions d'écologie microbienne et d'interactions avec l'hôte. De nos jours les probiotiques ont été établis comme une stratégie thérapeutique viable et de nombreux groupes de recherche ont démontré l'efficacité de certaines souches bactériennes sur l'atténuation des symptômes de l'inflammation, du développement de l'obésité et du diabète et la restauration du microbiote intestinal dans divers modèles animaux (voir I.1.D.d, I.2.C.c et revue en annexe). L'isolement et la sélection de nouvelles souches probiotiques est d'un intérêt majeur pour les domaines agro-alimentaire (santé de l'animal et optimisation de l'utilisation des ressources alimentaires, développement de nouvelles saveurs) et médicaux (alternative aux antibiotiques, atténuation des effets néfastes du mode de vie moderne sur la santé intestinale).

La sélection d'une souche probiotique se fait sur 5 critères : i) la tolérance au stress du tractus digestif, ii) la capacité d'adhésion à la barrière intestinale, iii) l'effet bénéfique sur la santé par la production de métabolites ou la compétition directe avec les pathogènes, iv) la sûreté d'utilisation, v) la possibilité d'être optimisée pour répondre aux critères industriels[347].

### III.2) Effets bénéfiques des bactéries lactiques de l'alimentation

En raison de leur utilisation répandue dans l'alimentation, notamment les produits à base de lait et les produits fermentés, les bactéries lactiques sont des candidates idéales pour une utilisation thérapeutique potentielle. Les produits fermentés en eux-mêmes ont souvent été associés à des effets bénéfiques pour la santé. Cela peut se faire soit en stimulant la prolifération de bactéries commensales bénéfiques pour l'hôte, soit par l'action directe des bactéries introduites.

Les bactéries lactiques sont naturellement retrouvées dans des environnements riches en nutriments tels que les végétaux ou le tractus digestif de nombreux animaux. On les retrouve en grande quantité dans les produits laitiers car elles y sont utilisées depuis l'Antiquité pour la production de fromage par exemple. Ce sont des bactéries gram-positives du genre *Clostridium* dont l'acide lactique est le principal produit issu de la fermentation des sucres. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives pouvant subsister dans un milieu de pH 4 pendant plusieurs semaines.

Des souches de *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* et *Streptococcus thermophilus* sont typiquement utilisées pour la production de yaourts auxquels une littérature extensive attribue des effets bénéfiques sur la digestion du lactose (notamment grâce à leur production en lactase), la diarrhée et constipation, le syndrome du côlon irritable, le cancer colorectal, la prise de poids et le développement du syndrome métabolique et du diabète de type 2[348]. *Lactococcus lactis* est utilisée dans la production de fromages et se retrouve également dans de nombreux produits végétaux[349]. On retrouve également des bactéries du genre *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Weissella* dans les produits de choux fermentés comme la choucroute[350] ou le kimchi[351].

Un certain nombre de molécules actives est produit par les bactéries lactiques. Par exemple des peptides associés aux laits fermentés tels que la valyl-prolyl-proline ou l'isoleucyl-prolyl-proline ont des propriétés antihypertensives et pourraient même être purifiés et utilisés directement[352]. Certaines souches comme *S. thermophilus*, *L. plantarum*, *L. lactis* ou *P. damnosus* peuvent également produire des exopolysaccharides -aux propriétés antioxydantes, immunomodulatrices, anti-diabétiques et anti-cholestérolémiques- pendant le processus de fermentation[353–355].

Les bactéries lactiques peuvent également augmenter la production d'AGCC dans l'intestin et contribuer au métabolisme énergétique ainsi qu'au maintien d'un pH approprié dans le colon ce qui est critique à la composition du microbiote et à l'homéostasie intestinale (1.2.C.a, figure 22). Certaines souches de bactéries lactiques peuvent entrer directement en compétition contre les pathogènes en produisant des molécules antimicrobiennes telles que des bactériocines, des acides organiques, de l'éthanol, du

diacétyl, du dioxyde de carbone ou du peroxyde d'hydrogène. Ces métabolites peuvent agir en tuant directement les bactéries et aussi en réduisant leur capacité à produire des toxines[356,357].

### III.3) Les bactéries lactiques recombinantes comme vecteurs de molécules thérapeutiques

Dans les dernières décennies s'est développé un intérêt pour l'utilisation de bactéries recombinantes à des fins thérapeutiques. L'administration d'une bactérie interagissant directement avec la muqueuse cible pourrait grandement augmenter l'efficacité et la spécificité du traitement ainsi que réduire les effets secondaires toxiques liés à l'administration systémique des molécules. Il serait également possible de stimuler localement l'immunité au moyen de vaccins à ADN ce qui permettrait une élimination rapide des infections par des bactéries pathogènes. La dissémination dans l'environnement de la souche génétiquement modifiée peut être prévenue en la rendant auxotrophe à un facteur de croissance (figure 31).

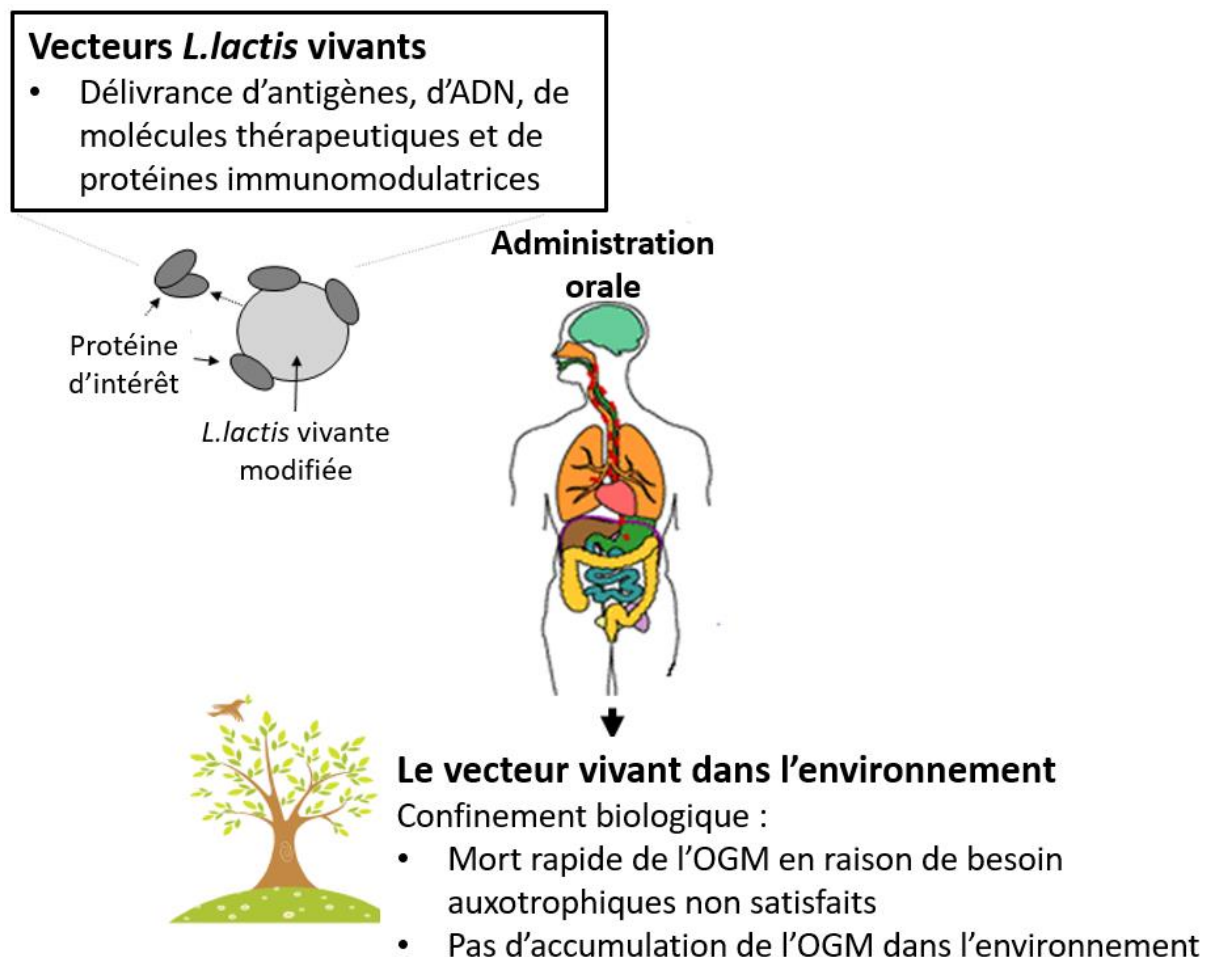


Figure 31. Avantages de l'utilisation de *L. lactis* comme vecteur (traduit à partir de Mohammed Bahey-El-Din, 2010).

### III.A) *L. lactis* comme modèle d'expression

*L. lactis* est un modèle microbien très utilisé comme système d'expression de molécules d'intérêt. Elle présente comme avantages d'être une bactérie « Generally Recognized As Safe » (une liste de substances considérées comme sûres comme additif alimentaire par la FDA et exemptes des tests de tolérance habituels), de ne pas produire d'endotoxine, de sécréter peu de protéines -seule Usp45 (Unknown Secreted Protein de 45 kDa) est sécrétée en quantité détectable par bleu de Coomassie[349]- et de posséder de nombreux systèmes de clonage et d'induction de vecteurs d'expression, ce qui en fait une bactérie idéale pour la production industrielle.

*L. lactis* est la bactérie lactique la mieux connue et la première à avoir eu son génome séquencé en raison de son importance dans l'industrie du fromage. Elle peut survivre au transit intestinal et sa grande sûreté et sa non-invasivité en font un candidat idéal pour l'administration chez l'être humain. Certaines souches ont des propriétés anti-inflammatoires en elles-mêmes comme *L. lactis* NCDO 2118[358], *L. lactis* subsp. cremoris FC[359] ou *L. lactis* ML2018[360] qui protègent dans un modèle murin contre la colite induite au DSS.

De nombreuses souches ont été séquencées et sont communément utilisées en laboratoire, notamment la souche *L. lactis* MG1363 et la souche *L. lactis* NZ9000 qui en est dérivée[361]. *L. lactis* MG1363 est également la souche la plus communément utilisée en industrie car elle ne possède pas de plasmide et ne produit qu'une seule protéase extracellulaire, HtrA ce qui en fait un outil robuste et facilement adaptable[362].

En l'an 2000, Steidler et al. ont utilisé un *L. lactis* sécrétant IL-10 pour atténuer la colite induite par le DSS chez la souris et prévenir la colite chez des souris IL-10 KO[363]. Une souche porteuse d'une modification génétique rendant *L. lactis* auxotrophe à la thymidine a été portée jusqu'en phase clinique et a permis de démontrer la sûreté de la méthode chez l'être humain et la maîtrise de sa dissémination dans l'environnement[364]. Depuis, de nombreuses molécules thérapeutiques ont été produites chez *L. lactis* et testées dans différents modèles animaux de maladies[349].

### III.B) Systèmes d'expression d'un gène par *L. lactis*

*L. lactis* est une bactérie mésophile dont la température de croissance optimale est à 30°C. Elle possède un certain nombre de promoteurs constitutifs plus ou moins forts utilisés en laboratoire pour lui conférer une résistance à un antibiotique, généralement le chloramphénicol, permettant sa sélection. Un grand nombre de systèmes d'expression ont été produits pour ce modèle.



Parmi les systèmes d'expression disponibles pour *L. lactis*, le système Nisin-Controlled Gene Expression (NICE) est le plus courant (figure 32). Il consiste en l'utilisation d'un gène promoteur régulé par la nisine -une molécule antibiotique produite naturellement par plusieurs souches de *L. lactis* et communément utilisée comme conservateur alimentaire- dans un plasmide exprimant un gène d'intérêt.

La souche dérivée de *L. lactis* MG1363 appelée *L. lactis* NZ9000 inclut les gènes régulateurs de la nisine nisRK dans le gène pepN chromosomique[361] mais il est également possible d'utiliser un système comprenant deux plasmides; l'un comportant nisRK et l'autre le vecteur d'expression[365]. Le vecteur d'expression contient le promoteur PnisA (ou le promoteur PnisF) suivi d'un site de clonage multiple permettant l'insertion du gène d'intérêt. Ce dernier n'est exprimé que lorsque la nisine est ajoutée pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne à une concentration comprise entre 0.01 et 10ng/mL[366]. Le niveau d'expression varie en fonction de la protéine exprimée mais est directement proportionnelle à la quantité de nisine utilisée pour l'induction et permet généralement une expression fonctionnelle suffisante pour purifier des quantités de l'ordre du milligramme[365]. La souche NZ9700 peut quant à elle être utilisée comme source de nisine ou être utilisée pour l'expression constitutive des gènes d'intérêt[366].

En fonction du gène souhaité, il existe des systèmes NICE permettant l'adressage des protéines exprimées à différents compartiments : le cytoplasme, la paroi bactérienne, la sécrétion extracellulaire.

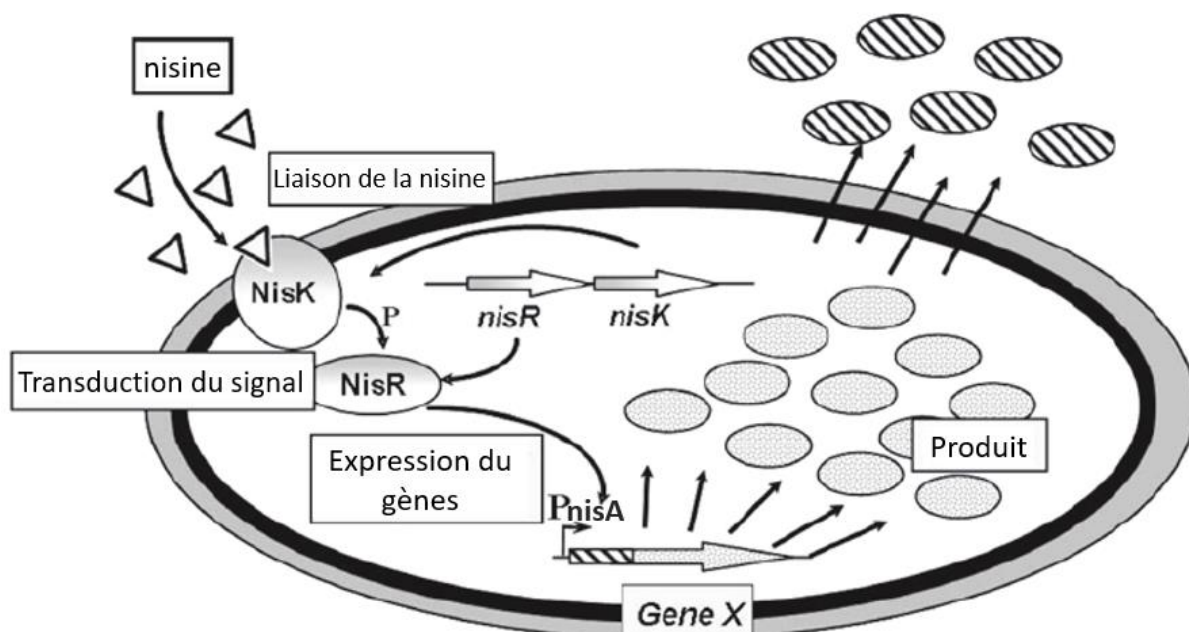


Figure 32. Le système Nisin-Controlled Gene Expression chez la bactérie productrice (traduit d'après Annie Frelet-Barrand, Sylvain Boutigny et al., 2010).

S. Nouaille et al. ont ajouté la protéine SecDF (impliquée dans la sécrétion chez *B. subtilis*) à la cassette d'expression dans un plasmide appelé pSEC[359] pour stimuler la production et la sécrétion de la protéine d'intérêt. D'autres vecteurs d'expression pCYT et pCWA permettent la stimulation de la production cytoplasmique et membranaire respectivement [360].

Enfin, le système NICE peut être utilisé dans un grand nombre de bactéries différentes telles que *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* ou *Leunostoc lactis*[365]. L'adaptabilité et la simplicité du système NICE a fait son succès comme outil de biologie moléculaire aux applications médicales et industrielles très variées. Bien entendu il existe d'autres types de systèmes d'induction. Par exemple : l'induction au xylose[361] permet de réduire les coûts par rapport à l'induction à la nisine.

L'adressage d'une protéine recombinante à la surface bactérienne peut être utilisée pour la fabrication de vaccins vivants. Un certain nombre d'études utilisent des *L. lactis* recombinant exprimant des antigènes de divers pathogènes tels que *Streptococcus mutans*[367], le fragment C-terminal de la toxine tétanique[368,369] ou l'antigène E7 du papillomavirus humain[370] et obtiennent ainsi une réponse immunitaire dans différents modèles animaux.

### III.C) L'utilisation de probiotiques comme vecteur de vaccins à ADN

Plus récemment, l'utilisation de *L. lactis* comme vecteur à vaccin à ADN a commencé à être explorée. Le principe consiste à délivrer un plasmide contenant une cassette d'expression avec l'ADNc d'une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur viral comme le promoteur du CytoMégaloVirus (pCMV) pouvant s'exprimer dans les cellules de mammifères. La cassette d'expression est insérée dans un plasmide répliquatif de *L. lactis* puis la bactérie portant ce plasmide est mise en contact avec les cellules eucaryotes cibles. L'incubation avec *L. lactis* recombinant portant un cDNA à la  $\beta$ -lactoglobuline (BLG) induit l'expression de celle-ci chez des cellules Caco-2, démontrant le transfert du plasmide fonctionnel aux cellules épithéliales[371]. Une administration orale de cette bactérie chez des souris permet d'obtenir la détection du plasmide et de la BLG dans l'intestin grêle 72h après le dernier gavage. Au bout de 6 jours après la dernière administration, la BLG comme le plasmide n'étaient plus détectables dans les tissus des animaux et ceux-ci ont développé une réponse immunitaire Th1 spécifique à la  $\beta$ -lactoglobuline[372].

Il est possible d'augmenter l'efficacité de la vaccination à ADN par *L. lactis* en augmentant son invasivité dans les cellules de l'hôte à l'aide du gène de l'Internaline A venant de *L. monocytogenes*. Des expériences sur des cellules Caco-2 et sur le cochon d'Inde ont démontré la faisabilité *in vivo* de ce procédé[373,374].

Le gène de la Fibronectin Binding Protein A de *S. aureus* a également permis d'augmenter la capacité d'internalisation de *L. lactis* et l'expression du plasmide codant pour la GFP dans des cellules Caco-2[374].

### III.4) Conclusion : L'utilisation des probiotiques comme vecteur de molécules thérapeutiques

Les bactéries lactiques recombinantes, notamment *L. lactis*, sont une stratégie efficace pour la délivrance de molécules thérapeutiques au plus près de la barrière intestinale. Elles peuvent également être utilisées comme vecteurs de vaccins à ADN et ont démontré leur capacité à induire l'expression des molécules d'intérêt par les cellules cible *in vitro* et *in vivo*.

L'utilisation industrielle des bactéries lactiques est déjà connue. Cependant leur utilisation à des fins thérapeutiques nécessiterait tout de même des ajustements afin de concilier production, intérêt médical, sûreté environnementale et dose d'utilisation.

## **Hypothèses et objectifs**



Ce travail porte sur l'effet des peptides antimicrobiens sur la dysbiose, le développement de l'inflammation de l'intestin et les troubles qui y sont associés. Durant cette thèse j'ai travaillé sur deux grands axes de maladies impliquant une dysbiose : 1) les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin modélisées par induction chimique au DSS ou au DNBS ; et 2) le syndrome métabolique induit par l'alimentation surgrasse.

L'administration entérique de peptides antimicrobiens est bénéfique dans les modèles d'inflammation de l'intestin et modifie la composition du microbiote intestinal. Notre hypothèse de départ est que les peptides antimicrobiens ont une activité immunomodulatrice reposant principalement sur leur capacité à réguler le microbiote intestinal et qu'une surexpression de ceux-ci par les cellules épithéliales aurait un effet protecteur sur l'inflammation. De nombreuses études confirment déjà l'effet protecteur de plusieurs PAMs dont LL37 et REG3A sur la colite induite ainsi que leurs effets potentiellement préventifs dans le développement du diabète chez le rongeur. L'expression des PAMs est dérégulée chez les patients atteints de certaines formes de MICI. Notamment, les cellules de Paneth perdent en fonction et sécrètent moins de PAMs dans la forme iléale de la MC. En effet, le taux de LL37 circulant est corrélé à un meilleur pronostic chez les patients de la MC et sa diminution est associée à des dommages tissulaires[263].

On retrouve de même une diminution de l'expression de PAMs, notamment Reg3 $\gamma$ , chez les souris nourries en régimes sur-gras. Celle-ci s'accompagne de changements de composition du microbiote intestinal et précède la surexpression des cytokines pro-inflammatoires [335]. Le syndrome métabolique se manifeste en raison d'une inflammation chronique systémique qui résulte en des dommages tissulaires et le développement de la résistance à l'insuline. Les patients ayant subi une chirurgie de bypass gastrique voient une augmentation de l'expression de REG3A [337]. Le microbiote intestinal régule l'activité des PPARs, notamment par la production d'ACGG, qui sont impliqués dans la réaction immunitaire mais également le métabolisme des acides gras et la tolérance à l'insuline[375]. Cependant le rôle de cette famille de PAMs dans l'obésité reste débattu. En effet Secq et al. ont observé une surexpression de REG3A chez des patients obèses ainsi qu'un gain de poids chez des souris transgéniques exprimant REG3A dans les cellules hépatiques tandis que d'autres études montrent que la surexpression de la cathélicidine murine, soit directement, soit par induction via IL22, protège les souris contre l'obésité induite via son influence sur le microbiote[340,376].

IL22 est une cytokine ayant des propriétés immunomodulatrices dont l'expression est réduite chez les patients obèses. Elle induit la production de peptides antimicrobiens et promeut la prolifération cellulaire et la réparation des tissus. En raison de cela elle est fortement étudiée comme traitement potentiel de

maladies inflammatoires et de l'obésité. Cependant son rôle dans l'inflammation relative à l'obésité est encore à éclaircir. Bien que l'administration d'IL22 exogène est généralement associée à une amélioration des symptômes du syndrome métabolique[377–379], certaines études montrent des résultats contradictoires[380]. Hendrikx et al. ont récemment démontré que l'effet protecteur d'IL22 sur la maladie du foie gras était conditionnée par l'expression de Reg3y chez la souris[381].

Nous utilisons *L. lactis* recombinant pour la délivrance de molécules ainsi que de vaccins à ADN permettant l'expression peptides antimicrobiens ou d'IL22 sur modèle murin dans un procédé qui a déjà fait ses preuves pour l'expression de molécules *in vitro* et *in vivo*[373,374,382–385].

**Ainsi les objectifs généraux de cette thèse sont :**

- L'étude du potentiel thérapeutique des peptides antimicrobiens et leur comparaison sur différents modèles. Pour la colite cela passe par le contrôle de la perte de poids et des dommages tissulaires au niveau du colon. Pour l'obésité cela passe par le contrôle du gain de poids, la glycémie, la lipidémie, les marqueurs d'évaluation des dommages hépatiques ainsi que l'observation histologique de l'accumulation des lipides dans le foie.
- L'évaluation de l'impact des PAMs sur la réponse immunitaire passant par la mesure de l'expression de marqueurs pro et anti-inflammatoires à l'échelle locale et systémique.
- L'étude de l'impact d'un traitement par les PAMs sur la composition du microbiote intestinal.
- L'évaluation du lien de corrélation entre microbiote intestinal et amélioration des symptômes.
- L'évaluation de *L. lactis* en tant que vecteur de molécule thérapeutique et des effets probiotiques potentiels de cette bactérie.

**Les objectifs spécifiques de cette thèse sont :**

- L'étude de l'effet de LL37 sur les symptômes de la colite induite chimiquement chez la souris
- L'évaluation du microbiote intestinal des souris traitées avec LL37 et sa mise en relation avec les symptômes observés
- La comparaison entre l'apport exogène de LL37 et l'apport endogène (par le vaccin à ADN) sur les symptômes de la colite induite
- L'étude des effets de l'apport en REG3A sur le syndrome métabolique chez des souris nourries avec une alimentation surgrasse
- L'étude des effets de la surexpression d'IL22 sur le syndrome métabolique et le microbiote et sa comparaison avec les effets de la surexpression de REG3A, en partant de l'hypothèse que l'effet d'IL22 est conditionné par celui des REG3 et la régulation du microbiote intestinal

**Chapitre 1 : Lactococcus lactis  
recombinant exprimant cDNA-LL37  
protège contre l'inflammation induite  
par le DNBS dans le modèle souris**





# *Lactococcus lactis* engineered to deliver hCAP18 cDNA alleviates DNBS-induced colitis in C57BL/6 mice by promoting IL17A and IL10 cytokine expression

Esther Borrás Nogues<sup>1</sup>, Camille Kropp<sup>1</sup>, Laureline Bétemps<sup>1</sup>, Cassiana de Sousa<sup>1,2</sup>, Florian Chain<sup>1</sup>, Sandrine Auger<sup>1</sup>, Vasco Azevedo<sup>2</sup>, Philippe Langella<sup>1</sup> and Jean-Marc Chatel<sup>\*1</sup>

## Abstract

With its antimicrobial and immunomodulating properties, the cathelicidin (LL37) plays an important role in innate immune system. Here, we attempted to alleviate chemically induced colitis using a lactococci strain that either directly expressed the precursor to LL37, hCAP18 (LL-pSEC:hCAP18), or delivered hCAP18 cDNA to host cells under the control of the cytomegalovirus promoter (LL-Probi-H1:hCAP18). We also investigated whether the alleviation of symptoms could be explained through modification of the gut microbiota by hCAP18.

Mice were administered daily doses of LL-pSEC:hCAP18 or LL-Probi-H1:hCAP18. On day 7, colitis was induced by DNBS. During autopsy, we assessed macroscopic tissue damage in the colon and collected tissue samples for the characterization of inflammation markers and histological analysis. Feces were collected at day 7 for 16S DNA sequencing. We also performed a fecal transplant experiment in which mice underwent colon washing and received feces from *L. lactis*-treated mice before DNBS-colitis induction.

Treatment with LL-Probi-H1:hCAP18 reduced the severity of colitis symptoms. The protective effects were accompanied by increased levels of IL17A and IL10 in mesenteric lymph node cells. *L. lactis* administration altered the abundance of *Lachnospiraceae* and *Muribaculaceae*. However, fecal transplant from *L. lactis*-treated mice did not improve DNBS-induced symptoms in recipient mice.

## Keywords

Cathelicidin, colitis, recombinant probiotics, *Lactococcus lactis*

## Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are multifactorial diseases associated with chronic inflammation of the gastrointestinal tract and dysbiosis of the patient's gut microbiota [386,387]. IBD pathogenesis is characterized by excessive and uncontrolled immune responses against commensal gut bacteria [388]. While antibiotics and anti-inflammatory drugs can help to make the condition manageable, IBD can have serious complications and no curative treatment currently exists.

The innate immune system plays an important role in initiating the inflammatory response. Antimicrobial peptides (AMPs)—a broad category of immune molecules that includes defensins and cathelicidins, among others—have various modes of action [389]; they may

function as wide-spectrum antibiotics that use a variety of methods to kill bacteria and fungi directly [390,391] or act as immunomodulators by altering host gene expression, inducing chemokine production [392], or modulating the response of the adaptive immune system [393]. AMPs have a crucial role in host defense against pathogens and the regulation of inflammatory responses by immune cells, and a decline in these molecules is associated with poor prognosis in IBD patients [331]. AMPs are currently being investigated as an alternative to antibiotics to prevent the spread of multiple-drug-resistant bacteria [394,395].

In the gut, the innate immune response and the production of AMPs play an essential role in maintaining homeostasis. In particular, much attention has focused on the family of AMPs known as cathelicidins, which are found in both mammals and non-mammals [396,397]. These peptides have been shown to influence inflammation and wound healing [325,398,399], mediate changes in the gut microbiota, and protect mice against chemically induced colitis. Human cathelicidin is encoded by the *CAMP* gene, the translation of which yields hCAP18, a small 18-kDa peptide. Following exocytosis, its C-terminal region is cleaved via the action of neutrophil proteinase 3 to form the 4.5-kDa peptide LL37 [275]. LL37 is able to disrupt bacterial membranes and thus has direct antibacterial properties [400]. It has been found in neutrophil extracellular traps and is also produced at the surface of various epithelia where it helps fight against pathogens [401–403]. Moreover, studies have described the immunomodulating and -stimulating effects of LL37 in diverse inflammation-related settings such as epithelial cell activation, chemotaxis, angiogenesis, and tissue wound repair. In particular, LL37 has been shown to use the Fpr1 receptor to mobilize human leucocytes, neutrophils, and T cells [318]. It is also able to suppress collagen synthesis, as the administration of exogenous cathelicidin in mice and human colonic fibroblasts has antifibrogenic effects [404,405]. Finally, LL37 appears to play an important role in IBD patients, who demonstrate a decreased circulating level of this molecule [51,331,406].

Multiple studies suggest that the composition of the gut microbiota—which can be modulated by the environment [407,408], diet [409,410], or drug treatment [411]—influences colitis severity. In humans, IBD is clearly associated with gut microbiota alterations although it is still unclear if the effect is causal [386]. One study found that mice who were deficient in mCRAMP (the hCAP18 ortholog in mice) were highly sensitive to DSS-induced colitis, which could be prevented by mCRAMP administration. Alterations were also evident in the gut microbiota of these mice, with increased levels of bacteria from the oral microbiota in their feces [306]. In the same study, wild-type mice that were co-housed with mCRAMP-deficient mice became highly sensitive to DSS-induced colitis, suggesting a causal link between gut microbiota and disease severity.

Therapies based on the oral administration of AMPs face significant challenges, as these molecules are quickly degraded before reaching the target site. For this reason, effective doses are typically very high, which raises problems associated with the high production costs and an increased potential for toxic side effects. To more efficiently and cost-effectively produce and deliver AMPs to their target site, one novel strategy is the use of recombinant probiotics

[384,412]. The concept of probiotics was first introduced by Lilly and Stilwell in 1965 [413]; they are live microorganisms that are considered safe for human consumption, with health benefits provided by their interactions with the gut microbiota or the host intestinal epithelium. Health benefits aside, probiotics have been proposed as a novel mechanism for drug delivery because of their ability to transit and interact with the intestinal barrier and gut bacteria [414]. Specifically, lactic acid bacteria, and *Lactococcus lactis* in particular, have attracted attention as a result of their health benefits, their lack of toxic metabolites, and their low number of secreted proteins. To date, these strains have been engineered to serve as vehicles for the production of therapeutic molecules and the delivery of DNA vaccines [382,414–416]. *L. lactis* that has been manipulated to contain a eukaryotic expression cassette containing cDNA of a protein of interest can be used as a delivery system for DNA that can then be expressed by the host's cells after transfection [371,383,385].

Here, we administered a recombinant strain of *L. lactis* that expresses hCAP18 (LL-pSEC:hCAP18) to mice and then induced colitis in these mice through DNBS intrarectal injection. Additionally, we used *L. lactis* as a vehicle for the delivery of hCAP18 cDNA (LL-ProBi-H1:hCAP18) to the gut epithelium of mice. This second strategy allowed the direct expression of the peptide by the host's cells [372]. We collected feces at day 0 and day 7 after bacterial administration for microbiota sequencing and fecal transplant into other groups of mice. Our aims were to compare the two strategies of AMP delivery with respect to their effectiveness in alleviating chemically induced colitis in mice, to understand the impact of each strategy on the host microbiota, and to determine if the mode of action of hCAP18 on the disease is dependent on its modulation of the gut ecosystem of the host.

## Results

### Delivery of hCAP18 cDNA alleviates DNBS-induced symptoms

The functionality of the ProBiH1:hCAP18 vector was verified by Western blot; a specific band at 18 kDa was detected in protein extracts 24h after transfection into HEK293 cells (data not shown). We then assessed the effects of the LL-ProBi-H1:empty or LL-ProBi-H1:hCAP18 recombinant strains following 7 days of gavage in a mouse model of acute DNBS-induced colitis (Fig. 1a). One day after DNBS injection, all groups of mice (DNBS control, LL-ProBi-H1:empty, and LL-ProBi-H1:hCAP18) had lost 10% of their body weight; three days after injection, mice in the DNBS control group had lost 15% of their weight and did not show any signs of recovery. Instead, mice that received treatment with either recombinant strain stabilized their weight after day 1 and began to recover some of the lost weight (Fig. 1b). Macroscopic scores measured 3 days after DNBS injection were significantly better (2.7-fold) in mice that received LL-ProBi-H1:hCAP18 compared to the DNBS control group (Fig. 1c), while mice that were treated with LL-ProBi-H1:empty showed no statistically significant improvement. Similarly, DNBS injection caused significant thickening of the bowel wall (0.76 mm), which was alleviated by LL-ProBi-H1:hCAP18 (0.59 mm) but not LL-ProBi-H1:empty (Fig. 2a). Bowel length was likewise affected by DNBS injection (7.34 cm in healthy control versus

6.52 cm in DNBS control) and this effect was alleviated by both LL-ProBi-H1:empty and LL-ProBi-H1:hCAP18.

To evaluate the effects of LL-ProBi-H1:hCAP18 on neutrophil infiltration, we measured the activity of myeloperoxidase (MPO) and the expression of lipocalin-2 in feces (Fig. 2c and 2d). DNBS injection induced a significant increase of MPO activity in LL-ProBi-H1:empty, LL-pSEC:empty and LL-pSEC:hCAP18 groups. DNBS induced MPO activity of LL-pSEC:empty treated mice was significantly higher than non-treated control mice. Compared to healthy controls, concentrations of lipocalin-2 in feces were much higher in all groups that received DNBS injections; however, the group treated with LL-ProBi-H1:hCAP18 had significantly lower lipocalin-2 expression than the DNBS control group (Fig. 2d).

#### **LL-pSEC:hCAP18 does not significantly improve DNBS-induced symptoms compared to LL-pSEC:empty.**

The functionality of the pSEC:hCAP18 plasmid was verified by Western blot following nisin induction of the LL-pSEC:hCAP18 strain. A specific band at 18 kDa was detected (data not shown). We then used this strain to study how the administration of hCAP18 in protein form differed from the effects of cDNA. Weight recovery was not different between LL-pSEC:empty and LL-pSEC:hCAP18 mice (Fig. 1b). Both LL-pSEC:hCAP18 and LL-pSEC:empty improved macroscopic score and reduced colon thickness compared to DNBS control (Fig. 1c and 2a). There were no significant differences among groups with respect to lipocalin-2 concentration in feces and MPO activity (Fig. 2c and d).

#### **Probi-H1:hCAP18 increases local IL10, IL17A production and reduces IFN- $\gamma$ secretion**

We studied the effects of LL-ProBi-H1:hCAP18 on the local immune response by measuring cytokine production in mesenteric lymph node (MLN) cells from our mice following stimulation with PMA ionomycin or CD3<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup>. Following reactivation with either method, IL17A production was high in the MLN cell supernatants from the LL-ProBi-H1:hCAP18 group, suggesting an increased Th17 effector cell response (Fig. 3b1 and b2). Furthermore, we observed significantly higher levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the MLN cell supernatant of the LL-ProBi-H1:hCAP18 group compared to the DNBS and LL-ProBi-H1:empty groups following stimulation with PMA ionomycin (Fig. 3a1). Finally, the PMA ionomycin-treated MLN cell supernatants from the LL-ProBi-H1:empty group demonstrated high levels of the pro-inflammatory cytokine IFN- $\gamma$  (Fig. 3c1). We found no significant differences between our treatment groups in the expression of TNF- $\alpha$ , IL17A, and IL22 mRNA in colon tissues (data not shown).

#### **Comparison of fecal microbiota composition among treatment groups**

We analyzed fecal microbiota composition by 16S sequencing after 7 days of gavage with PBS glycerol and LL-ProBiH1:empty or LL-ProBiH1:hCAP18. No significant difference in alpha diversity was found among groups (observed or Shannon index), although mice that received recombinant *L. lactis* had slightly decreased diversity compared with the PBS glycerol control group. With respect to the composition of the fecal microbiota, we detected a slight shift in

mice that received LL-Probi-H1:empty or LL-Probi-H1:hCAP18 compared to control mice; *L. lactis* treatment was found to be responsible for a portion of the variation in the data (PERMANOVA,  $R^2=0.114537$ ,  $F= 1.8079$ ,  $p=0.005$ , see Table S1). However, there was no relationship between patterns of community composition and macroscopic score (PERMANOVA,  $R^2=0.16878$ ,  $F= 1.0152$ ,  $p=0.424$ , see Table S2). We examined a total of 704 OTUs in 31 total samples; these represented 5 phyla (Figure 4a), 8 classes, 23 orders, 33 families, and 77 identified genera. Patterns of differential abundance were evaluated using the DESeq2 package in R. Compared to the control PBS glycerol group, several taxa were differentially abundant in the LL-Probi-H1:hCAP18 group (9 families, 13 OTUs) and LL-Probi-H1:empty group (4 families, 6 OTUs). In the former comparison, the taxa affected were identified as Muribaculaceae (5 OTUs), Ruminococcaceae (2 OTUs), and Lachnospiraceae (1 OTU) (Fig. 4D, Table S3), while the taxa highlighted in the latter comparison were assigned to Muribaculaceae (1 OTU), Ruminococcaceae (1 OTU), Clostridia (1 OTU), and Lachnospiraceae (3 OTUs) (Fig. 5c). However, only 1 OTU, from the Muribaculaceae family (cluster\_116), was highlighted by both contrasts (Table S3). Instead, a comparison of the LL-Probi-H1:empty and LL-Probi-H1:hCAP18 groups revealed no patterns of differential abundance.

### **Effects on DNBS-induced colitis of fecal transplant from mice treated with LL-ProBi-H1:empty or LL-ProBi-H1:hCAP18**

In order to evaluate whether, and to what extent, the protective effects we detected were mediated by shifts in the microbiota, we performed fecal transplants from donor mice who were gavaged with PBS glycerol and either LL-ProBi-H1:empty or LL-ProBi-H1:hCAP18. Recipient mice were first subjected to colon washes with PEG and then received oral gavages of fecal material from donor mice following the protocol shown in Figure 5a. After transplantation, the recipient mice were injected with DNBS in order to induce colitis. There were no significant differences between control and treatment groups with respect to symptoms such as weight loss (Fig. 5b), colon thickness (Fig. 5c) or macroscopic score (Fig. 5d). There were also no differences in MPO activity (Fig. 5e) among the groups.

### **Discussion**

In our study, we investigated the protective effect of human cathelicidin (hCAP18) in DNBS induced colitis, using *L. lactis* as a vector for the delivery of either the protein or cDNA forms of this molecule. *L. lactis* is a food-grade lactic acid bacterium that is considered to be non-invasive and non-colonizing, and has previously demonstrated potential for this type of treatment. For example, after 7 days of DSS-induced colitis in mice, the administration of 10 log cfu of *L. lactis* that was engineered to express mCRAMP under the control of nisin was found to reduce clinical symptoms and tissue damage better than sulfasalazine [417] and was associated with lower expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Another team found similar results with reduction of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , increased production of IL-10 and upregulation of tight junction proteins ZO-1, ZO-2 and occludin[418]. Here, we observed that treatment with the recombinant strain LL-Probi-H1:hCAP18 reduced DNBS-induced colitis symptoms in mice. Interestingly, when we repeated the experiment in a DSS-induced model

of colitis we found no significant effect on symptoms induced by DSS (data not shown). The discrepancy between the results of our DSS experiment and this previous work may be explained by the different protocols used: unlike the earlier study, we included a recovery period of 6 days after DSS treatment and used a cathelicidin of human origin.

One of our main goals was to compare how the effects of hCAP18 differ depending on its mode of delivery: exogenous delivery (LL-pSEC:hCAP18) or endogenous production after delivery via DNA vaccine (LL-Probi-H1:hCAP18). We first verified that the LL-pSEC:hCAP18 strain was able to produce hCAP18 and that Probi-H1:hCAP18 could induce hCAP18 production in mammal cells using Western blot analysis (data not shown). We then characterized the effects of both strains in mice with DNBS-induced colitis. Treatment with LL-Probi-H1:hCAP18 improved disease symptoms compared to DNBS control (see Fig. 1 and 2; weight recovery, bowel length, bowel thickness, and macroscopic tissue damage). The administration of LL-Probi-H1:empty also had a positive effect on weight recovery and bowel length; however, compared to healthy controls, expression of the pro-inflammatory cytokine IFN- $\gamma$  was significantly higher in the MLN cells of mice in this group. Instead, treatment with LL-Probi-H1:hCAP18 restored IFN- $\gamma$  to normal levels (Fig. 3C1). Symptoms in the mice treated with LL-pSEC:empty or LL-pSEC:hCAP18 were also significantly ameliorated compared to the DNBS control group, but there was no difference between these two treatment groups (Fig. 1 and 2). It thus appeared that *L. lactis* by itself had protective properties toward DNBS-induced symptoms that could mask the effects of the hCAP18 it produced. However, we observed that endogenous production of hCAP18, as induced by DNA vaccine delivery, strengthened the protective effects of this bacterium; mice treated with LL-Probi-H1:hCAP18 were more protected from developing symptoms of colitis than those who were treated with LL-pSEC:hCAP18. This result may be due to differences in the final processing step of hCAP18. As noted earlier, in order to produce the antimicrobial peptide LL37, hCAP18 must be processed by proteinase 3, which is mainly produced and secreted by neutrophils [13]. We can hypothesize that hCAP18 delivered into the lumen by LL-pSEC:hCAP18 is less accessible to proteinase 3 than hCAP18 produced by epithelial cells after delivery by LL-Probi-H1:hCAP18. Although this point remains to be clarified, our results confirm the potential of *L. lactis* as a vehicle for the production of therapeutic molecules via DNA vaccine delivery.

Treatment with LL-Probi-H1:hCAP18 was also associated with elevated levels of the anti-inflammatory cytokine IL10. IL10 is an important regulator of intestinal homeostasis and prevents pro-inflammatory responses by T-cells [419] and macrophages [420]. Surprisingly, we also found increased levels of putatively proinflammatory IL17A in MLNs of this group. High levels of this cytokine have been found in patients with an active form of ulcerative colitis [421], but the beneficial or detrimental nature of its effects are still up for debate. IL17 KO mice subjected to DSS-induced colitis show increased survival and reduced tissue damage compared to wild-type controls [58]. Anti-IL17 treatments such as Ixekizumab, Brodalumab, or Secukinumab are FDA-approved and widely used in the treatment of psoriasis [422] but, paradoxically, the use of IL17 blockers to treat IBD has been shown to exacerbate symptoms

[423–425]. Similarly, the use of anti-IL17 monoclonal antibodies was found to exacerbate DSS-induced colitis in mice and increase the expression of pro-inflammatory markers such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-6 [426]. Other research has reported an association in colitis between IL17 and preservation of epithelial barrier integrity through stimulation of cell proliferation and AMP production [427]. A 2020 study suggested that IL17A deficiency in chronic colitis upregulates IL6 expression and leads to the recruitment of ROR $\gamma$ t+ innate lymphoid cells in a negative feedback loop; the authors proposed this mechanism to explain the discrepancies between the insensitivity of IL17A-KO mice to acute colitis and the otherwise negative correlation between IL17A and worsening symptoms [428]. However, increased IL17A levels are not necessarily associated with worse symptoms in all models of acute colitis; its effects are heavily dependent on the surrounding circumstances. For example, IL10-/- mice spontaneously develop colitis that is greatly aggravated by IL17A deficiency [429], while Minns et al. found that mCRAMP is required for Th17 differentiation and reported increased production of IL17A in the context of inflammation [430].

In order to investigate the importance of the anti-microbial activity of hCAP18 in the protective effects noted here, we studied how an increase in host production of hCAP18, and potentially LL37, affected the composition of the gut microbiota. Previous findings suggested that mCRAMP deficiency modified the microbiota in such a way as to make wild-type cagemates of mCRAMP-/- mice more susceptible to DSS-induced colitis [306]. We characterized the microbiota of mice using 16S sequencing of fecal samples and observed a slight but significant shift in community composition in LL-Probi-H1:hCAP18-treated mice compared to the control group. Multiple OTUs assigned to family *Muribaculaceae* increased in abundance, whereas certain members of *Lachnospiraceae* declined (Fig. 4). However, we must keep in mind that the sequencing method we used only gives us a global view of the microbiota composition, and it is difficult to determine if such minor changes are relevant. For this reason, we also tested if the microbiota from treated mice could protect untreated recipient mice from inflammation. We found that fecal transplantation from LL-Probi-H1:hCAP18-treated mice to PEG-washed recipient mice did not significantly reduce symptoms of DNBS-induced colitis (Fig. 5). One potential explanation of this result is that these wild-type mice had normal expression of mCRAMP during inflammation, and additional cathelicidin might not have changed the microbiota in a helpful way. Although, it is possible that the antimicrobial effects of hCAP18 are specific to human-associated microbiota and therefore would not have much impact on mice-associated species. To fully understand the effects of LL37 on the microbiota, further investigation should be done on a local scale by analyzing the composition of the mucosal microbiota.

## Materials and methods

### Plasmid cloning and *L. lactis* transformation

hCAP18 synthetic cDNA optimized for *L. lactis* expression was cloned into a pSEC plasmid as described in [431] to create pSEC:hCAP18; this was then transformed in *L. lactis* NZ9000 to create the recombinant strain LL-pSEC:hCAP18, in which the induction of hCAP18 was nisin-



dependent. hCAP18 synthetic cDNA optimized for expression in mice was cloned into the proBi-H1 plasmid to create proBi-H1:hCAP18; this plasmid vector contained the repA and repC origin of replication, the chloramphenicol resistance gene, and the expression cassette from pcDNA3 (Invitrogen) as published before[432]. The resulting vector was 3.7 kb long. The proBi-H1:hCAP18 plasmid was transformed in *Lactococcus lactis* MG1363 to create the recombinant strain LL-ProBi-H1:hCAP18.

### **Bacterial strain preparation**

LL-pSEC bacteria were preincubated at 30°C overnight in M17 broth medium with 0.5% glucose and chloramphenicol (10 µg/mL). The optical density (OD) of the initial culture was 0.2; nisin (10 ng/mL) was added 1 h after the start of incubation and bacteria were incubated for another 1.5 h (OD=1.2). Bacteria were harvested by centrifugation at 8000g for 5min at 4°C and washed 3 times with PBS. They were concentrated 5 times in PBS with 16% glycerol and frozen until gavage.

LL-Probi-H1 bacteria were preincubated in the same conditions; initial culture OD was 0.2 and culturing ended at OD 1.7-1.8. Bacteria were harvested by centrifugation at 8000g for 5min at 4°C and washed 3 times with PBS. They were concentrated 10 times in PBS with 16% glycerol and 10<sup>9</sup> cfu of bacteria were administered orally to mice every day. Cell counts were quantified on M17 with 0.5% glucose (10 µg/mL of chloramphenicol) agar plates to assess viable cfu concentrations.

### **HEK293 culture cell for protein expression of plasmid**

Probi-H1:hCAP18 functionality was checked by transfection in HEK293 cells with Probi-H1:empty as control. The HEK293 cell line came from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium + GlutaMAX™ (DMEM, Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Eurobio), 1% sodium pyruvate (Gibco), and 1% streptomycin/penicillin (Sigma), and incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 10% CO<sub>2</sub>. Cells were passed at 80% confluence and seeded in 24-well plates at 8\*10<sup>4</sup> cells/well, then incubated for 24 hours.

Transfection of 50ng of plasmids was performed with Lipofectamine LTX with Plus Reagent (Invitrogen) in opti-MEM® medium (Gibco, Life Technologies). HEK293 cells were co-incubated with their plasmid mix for 4 hours after which the medium was replaced with complete medium. After 24h of incubation, the supernatant was removed and cells were lysed in Passive Lysis Buffer 1X (Promega). Protein expression was then checked by western blot.

### **Protein extraction from *Lactococcus lactis***

To control the expression of hCAP18 by LL-pSEC:hCAP18, bacteria were incubated overnight in 10mL of broth medium and harvested by centrifugation at 8000g for 5min at 4°C. Bacteria were physically lysed with Precellys® in cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche) and cell debris was removed by centrifugation at 8000g for 5min. Protein expression was then checked by western blot.

### **Western blot**

Protein extracts were boiled at 95°C for 5min in Laemmli buffer. Gel electrophoresis was performed with 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Cat #456896, Bio-Rad) and PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Cat #26617, thermoscientific). Proteins were then transferred on membrane using Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Cat #1704156, Bio-Rad). Nitrocellulose membrane were saturated in tris-buffered saline, 0.1% tween, 5% dry milk. Primary antibody was the monoclonal LL-37/CAP-18, Human, mAb 3D11 (Cat #HM2070-100UG, Hycult Biotech) and secondary antibody was goat-produced Anti-Mouse IgM ( $\mu$ ) Affinity purified antibody HRP (Cat #BI 2413C). The substrate mixture used was the Clarity Western ECL Substrate (Cat #1705060, Bio-Rad). Digital imaging was performed on the ChemiDoc™ MP System.

### **Experimental conditions for mice**

Male C57BL/6JRj mice (6 weeks old) were purchased from Janvier Labs (France) and kept at the INRAE animal facility in accordance with institutional ethical guidelines. The study was approved by the COMETHEA ethics committee (“Comité d’Ethique en Expérimentation Animale”) of the Centre INRAE of Jouy-en-Josas and AgroParisTech (n°16744-201807061805486). They were fed *ad libitum*, given autoclaved tap water, and housed in groups of four mice per cage in an air-conditioned room with controlled temperature and circadian cycle (12 h light, 12 h dark).

### ***Lactococcus lactis* and DNBS treatment groups**

Colitis was induced by a single intrarectal injection of DNBS (150 mg/kg of body weight) dissolved in 30% ethanol. Mice were anesthetized prior to injection. Control mice were injected with 30% ethanol. Mice were monitored daily for weight loss after intrarectal injection.

Mice were divided into six different groups: healthy control, DNBS control, DNBS + 10<sup>9</sup> cfu LL-pSEC:empty (nisin induction), DNBS + 10<sup>9</sup> cfu LL-ProBiH1:empty (DNA delivery system), DNBS + 10<sup>9</sup> cfu LL-pSEC:hCAP18, or DNBS + 10<sup>9</sup> cfu LL-ProBiH1:hCAP18. Bacteria were administered daily by intragastric gavage for 7 days prior to intrarectal injection of DNBS. Gavages continued until the end of the experiment, 3 days after DNBS injection. After DNBS injections, mice were monitored daily for weight loss. Mice were sacrificed by cervical dislocation at day 3 after injection, the abdomen was opened by midline incision, the colon and Mesenteric Lymphatic Node (MLN) were removed. MLN were stocked in DMEM medium on ice. They were later mashed and counted before stimulation with antiCD3 and anti-CD28 antibodies for 48 h at 37°C and 10% CO<sub>2</sub>. Colons were opened longitudinally, cleaned and measured for scoring.

### **PEG wash and fecal transplantation**

In the fecal transplantation group, mice were fasted and the cage litter was changed 1 hr before colon washing, in which mice were fed 200  $\mu$ L polyethylene glycol (PEG) four consecutive times, with a 20-minute interval between feedings, as described in [433]. They

were then fed 200  $\mu$ L fecal content by intragastric gavage 3 h after the final PEG dose. Fecal content was given to mice twice a week for 3 weeks after the initial PEG wash.

### **Macroscopic scoring and histologic sampling**

Macroscopic tissue damage was assessed the day of autopsy with a protocol adapted from the rat [434]. Macroscopic criteria for scoring include the presence of adhesions between the colon and other organs, colon wall thickening, gastrointestinal transit issues, ulcers and hyperemia. Colon thickness was measured at the anal extremity and colon length was measured between the anal extremity and caecal junction.

### **Chemokines secretion by stimulated lymphocytes**

Mesenteric Lymph Nodes (MLN) were taken from mice during autopsy. They were crushed and filtered (70  $\mu$ m, BD biosciences) in DMEM (gibco, ref. 61965-026). Lymphocytes were counted by flow cytometry (Accuri C6) and suspended in DMEM with 100 Unit of Streptomycin, Penicillin (sigma, ref.P4333) and 10% Fetal Calf Serum (FCS) (Eurobio, ref. CVFSV00-01) at a concentration of  $2.5 \cdot 10^5$  cells/mL either in 24 wells plate (Costar) pre-incubated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, 4  $\mu$ g/mL of each antibody (eBioscience) in PBS or stimulated with PMA ionomycin (eBioscience ref.00-4970-93). Plates were incubated 48 h at 37°C, 10% of CO<sub>2</sub> and cytokine level was assessed by ELISA MAX™ Standard Set Mouse (BioLegend). The cytokines tested were Th1- related cytokine (IFN $\gamma$ ); Th17-related cytokine (IL17) and Treg- related cytokine (IL10).

### **Myeloperoxidase activity in colon**

Colon samples were homogenized using a Precellys® Evolution (Bertin Instruments) in a hexadecyltrimethylammonium bromide buffer (H9151, Sigma-Aldrich). MPO was detected with O-dianisidine solution (D3252, Sigma-Aldrich) with 1% hydrogen peroxide solution (216763, Sigma-Adrich) added just before measurement. OD was measured using Infinite M200 PRO (TECAN) and normalized to colon mass.

### **mRNA extraction and qPCR**

RNA extraction was performed with the RNeasy Mini Kit from Qiagen (Cat No./ID: 74106) according to the manufacturer's recommendations, with the use of the RNase-Free DNase Set (Cat No./ID: 79254). Reverse transcription was performed with an Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (cat.4368814). Real-Time PCR was performed with Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (UF-RSMT-B0701) with the primers described in Table 1.

### **DNA extraction and 16S DNA sequencing**

DNA was extracted using the protocol of Godon et al. [435]. DNA concentration and purity were determined using a NanoDrop instrument. We used the KAPA HiFi HotStart ReadyMix with 10 ng of extracted DNA for PCR amplification of the V3-V4 region of 16S rDNA. The amplification was performed with the primers MSQ-16SV3F (CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCWGCAG) and MSQ-16SV4R (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT). PCR conditions were: 95°C for 3 minutes; 30 cycles at 98°C for 20 seconds, 65°C for 30 seconds, and 72°C for

1 minute; and a final extension of 72°C for 10 minutes. Amplification products were checked via electrophoresis on 2% agarose gel.

#### Statistical analysis of sequencing data

16S sequencing data were uploaded to the Galaxy platform [436,437] at <https://galaxy.migale.inra.fr/>. We used the FROGS pipeline to produce abundance tables of operational taxonomic units (OTUs). Denoising and clustering were performed with SWARM, chimera removal with VSEARCH, and affiliation with RDP Classifier using the 16S\_SILVA\_Pintail100\_138 database. OTUs with a minimum presence of 0.005% in all sequences were kept. OTUs were filtered for a minimum identity of 97% and a minimum coverage of 95%. Measures were calculated of  $\alpha$ - (observed and Shannon index) and  $\beta$ -diversity (Bray-Curtis dissimilarity score). Analysis of differential expression was performed using RStudio version 3.6.1 with the DESeq2 package.

#### Statistical analysis of macroscopic symptoms and inflammatory markers

Graphics were created in Prism-GraphPad®. Macroscopic results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). ELISA are represented in Tukey's boxplot. Data was checked for normal distribution with the Shapiro-Wilk test. Outliers were removed from normally distributed data using the ROUT method (Q=1%). Data were analyzed by Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test or analysis of variance (ANOVA) with Turkey's post-hoc test if they were normally distributed. In all results, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001.

#### References

1. Khan, I. *et al.* Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): Cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome. *Pathogens* vol. 8 (2019).
2. Nishida, A. *et al.* Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology* vol. 11 1–10 (2018).
3. Zhang, M. *et al.* Interactions between Intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.* **8**, 1 (2017).
4. Kahlenberg, J. M. & Kaplan, M. J. Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. *J. Immunol.* **191**, 4895–4901 (2013).
5. Hancock, R. E. W. & Falla, T. J. *Antimicrobial peptides: broad-spectrum antibiotics from nature THE CATIONIC PEPTIDES OF NATURE.* *Clinical Microbiology and Infection* vol. 1 (1996).
6. Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A. & Kisich, K. The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 2377–2392 (2009).
7. Niyonsaba, F. *et al.* Antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 594–604 (2007).

8. Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwak, L. W. & Yang, D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. in *Annals of the Rheumatic Diseases* vol. 62 17–21 (BMJ Publishing Group, 2003).
9. Tran, D. H.-N. *et al.* Circulating cathelicidin levels correlate with mucosal disease activity in ulcerative colitis, risk of intestinal stricture in Crohn's disease, and clinical prognosis in inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.* **17**, 63 (2017).
10. Mwangi, J., Hao, X., Lai, R. & Zhang, Z. Y. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zoological research* vol. 40 488–505 (2019).
11. Wang, S., Zeng, X., Yang, Q. & Qiao, S. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 (2016).
12. Alford, M. A., Baquir, B., Santana, F. L., Haney, E. F. & Hancock, R. E. W. Cathelicidin Host Defense Peptides and Inflammatory Signaling: Striking a Balance. *Frontiers in Microbiology* vol. 11 (2020).
13. Cheng, Y. *et al.* Evolution of the avian  $\beta$ -defensin and cathelicidin genes. *BMC Evol. Biol.* **15**, (2015).
14. Huynh, E., Penney, J., Caswell, J. & Li, J. Protective effects of protegrin in dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Front. Pharmacol.* **10**, 156 (2019).
15. Wu, J. *et al.* A frog cathelicidin peptide effectively promotes cutaneous wound healing in mice. *Biochem. J.* **475**, 2785–2799 (2018).
16. Grönberg, A., Mahlapuu, M., Ståhle, M., Whately-Smith, C. & Rollman, O. Treatment with LL-37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Wound Repair Regen.* **22**, 613–621 (2014).
17. Sørensen, O. E. *et al.* Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951–3959 (2001).
18. Thennarasu, S. *et al.* Antimicrobial and membrane disrupting activities of a peptide derived from the human cathelicidin antimicrobial peptide ll37. *Biophys. J.* **98**, 248–257 (2010).
19. Braff, M. H., Zaiou, M., Fierer, J., Nizet, V. & Gallo, R. L. Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect. Immun.* **73**, 6771–6781 (2005).
20. Hiemstra, P. S., McCray, P. B. & Bals, R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur. Respir. J.* **45**, 1150–1162 (2015).
21. Gordon, Y. J. *et al.* Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr. Eye*

- Res.* **30**, 385–394 (2005).
22. De Yang, B. *et al.* LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1069–1074 (2000).
  23. Yoo, J. H. *et al.* Antifibrogenic Effects of the Antimicrobial Peptide Cathelicidin in Murine Colitis-Associated Fibrosis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 55-74.e1 (2015).
  24. Park, H. J. *et al.* Collagen synthesis is suppressed in dermal fibroblasts by the human antimicrobial peptide LL-37. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 843–850 (2009).
  25. Sharifi, A., Hosseinzadeh-Attar, M. J., Vahedi, H. & Nedjat, S. A randomized controlled trial on the effect of vitamin D3 on inflammation and cathelicidin gene expression in ulcerative colitis patients. *Saudi J. Gastroenterol.* **22**, 316–23 (2016).
  26. Sun, L., Wang, W., Xiao, W. & Yang, H. The Roles of Cathelicidin LL-37 in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, 1986–1991 (2016).
  27. Fan, T. J. *et al.* Environmental factors modify the severity of acute DSS colitis in caspase-11-deficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* **24**, 2394–2403 (2018).
  28. Bilski, J. *et al.* Can exercise affect the course of inflammatory bowel disease? Experimental and clinical evidence. *Pharmacological Reports* vol. 68 827–836 (2016).
  29. Sideri, A. *et al.* Effects of obesity on severity of colitis and cytokine expression in mouse mesenteric fat. Potential role of adiponectin receptor 1. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **308**, G591–G604 (2015).
  30. Llewellyn, S. R. *et al.* Interactions Between Diet and the Intestinal Microbiota Alter Intestinal Permeability and Colitis Severity in Mice. *Gastroenterology* **154**, 1037-1046.e2 (2018).
  31. Munyaka, P. M., Eissa, N., Bernstein, C. N., Khafipour, E. & Ghia, J. E. Antepartum antibiotic treatment increases offspring susceptibility to experimental colitis: A role of the gut microbiota. *PLoS One* **10**, (2015).
  32. Yoshimura, T. *et al.* The Antimicrobial Peptide CRAMP Is Essential for Colon Homeostasis by Maintaining Microbiota Balance. *J. Immunol.* **200**, 2174–2185 (2018).
  33. Mandal, S. M., Silva, O. N. & Franco, O. L. Recombinant probiotics with antimicrobial peptides: A dual strategy to improve immune response in immunocompromised patients. *Drug Discovery Today* vol. 19 1045–1050 (2014).
  34. De Azevedo, M. *et al.* In vitro and in vivo characterization of DNA delivery using recombinant *Lactococcus lactis* expressing a mutated form of *L. monocytogenes* Internalin A. *BMC Microbiol.* **12**, 299 (2012).
  35. Lilly, D. M. & Stillwell, R. H. Probiotics: Growth-promoting factors produced by

- microorganisms. *Science (80-. )*. **147**, 747–748 (1965).
36. Carvalho, R. D. D. O. *et al.* Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. *Frontiers in Microbiology* vol. 8 (2017).
  37. Tavares, L. M. *et al.* Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 8 517166 (2020).
  38. Bermúdez-Humarán, L. G. *et al.* Effects of intranasal administration of a leptin-secreting *Lactococcus lactis* recombinant on food intake, body weight, and immune response of mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5300–5307 (2007).
  39. Bermúdez-Humarán, L. G. *et al.* Engineering lactococci and lactobacilli for human health. *Current Opinion in Microbiology* vol. 16 278–283 (2013).
  40. Guimarães, V. D. *et al.* Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7091–7097 (2006).
  41. de Azevedo, M. *et al.* Recombinant invasive *Lactococcus lactis* can transfer DNA vaccines either directly to dendritic cells or across an epithelial cell monolayer. *Vaccine* **33**, 4807–4812 (2015).
  42. Mancha-Agresti, P. *et al.* Recombinant invasive *Lactococcus lactis* carrying a DNA vaccine coding the Ag85A antigen increases INF- $\gamma$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  cytokines after intranasal immunization. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
  43. Chatel, J. M. *et al.* In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Ther.* **15**, 1184–1190 (2008).
  44. Miyoshi, A. *et al.* Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3141–3146 (2002).
  45. Meynier, M. *et al.* AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms. *Gut Microbes* **14**, (2022).
  46. Wrzosek, L. *et al.* Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota OPEN. **8**, 6854 (2018).
  47. JL, W., WK, M., GP, M. & PL, B. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **96**, 29–36 (1989).
  48. Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. & Moletta, R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2802–2813 (1997).
  49. Afgan, E. *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **46**, W537–W544 (2018).

50. Escudié, F. *et al.* FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **34**, 1287–1294 (2018).
51. Wong, C. C. M. *et al.* Protective effects of cathelicidin-encoding *Lactococcus lactis* in murine ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **27**, 1205–1212 (2012).
52. Li, J. *et al.* Recombinant CRAMP-producing *Lactococcus lactis* attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis by colonic colonization and inhibiting p38/NF- $\kappa$ B signaling. *Food Nutr. Res.* **65**, 1–11 (2021).
53. Rodrigues, V. F. *et al.* Acute infection with *Strongyloides venezuelensis* increases intestine production IL-10, reduces Th1/Th2/Th17 induction in colon and attenuates Dextran Sulfate Sodium-induced colitis in BALB/c mice. *Cytokine* **111**, 72–83 (2018).
54. Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S. & Medzhitov, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* (80- ). **356**, 513–519 (2017).
55. Krawiec, P. & Pac-Kozuchowska, E. Serum interleukin 17A and interleukin 17F in children with inflammatory bowel disease. *Sci. Rep.* **10**, 12617 (2020).
56. Canavan, T. N., Elmets, C. A., Cantrell, W. L., Evans, J. M. & Elewski, B. E. Anti-IL-17 Medications Used in the Treatment of Plaque Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Comprehensive Review. *American Journal of Clinical Dermatology* vol. 17 33–47 (2016).
57. Wang, J. *et al.* Rapid Onset of Inflammatory Bowel Disease after Receiving Secukinumab Infusion. *ACG Case Reports J.* **5**, e56 (2018).
58. Targan, S. R. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study of brodalumab in patients with moderate-to-severe Crohn’s disease. *Am. J. Gastroenterol.* **111**, 1599–1607 (2016).
59. Hueber, W. *et al.* Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn’s disease: Unexpected results of a randomised, double-blind placebo- controlled trial. *Gut* **61**, 1693–1700 (2012).
60. Ogawa, A., Andoh, A., Araki, Y., Bamba, T. & Fujiyama, Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin. Immunol.* **110**, 55–62 (2004).
61. Whibley, N. & Gaffen, S. L. Gut-Busters: IL-17 Ain’t Afraid of No IL-23. *Immunity* vol. 43 620–622 (2015).
62. Park, C. H., Lee, A. reum, Ahn, S. B., Eun, C. S. & Han, D. S. Role of innate lymphoid cells in chronic colitis during anti-IL-17A therapy. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
63. Tachibana, M. *et al.* Ablation of IL-17A leads to severe colitis in IL-10-deficient mice: Implications of myeloid-derived suppressor cells and NO production. *Int. Immunol.* **32**, 187–201 (2019).



64. Minns, D. *et al.* The neutrophil antimicrobial peptide cathelicidin promotes Th17 differentiation. *Nat. Commun.* **12**, 1–16 (2021).

## **Acknowledgments**

Colon tissues were sampled and fixed in paraformaldehyde solution and processed for paraffin embedding. Hematoxylin-eosin staining, paraffin embedding, sample section, and microscopy were performed at the histology facility of UMR 1313 GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France.

Sequencing was performed at the @BRIDGe facility at INRA Jouy-en-Josas using the Illumina Miseq (250x2 bp) system.

## **Authors affiliations**

**Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR1319, MICALIS, 78352 Jouy en Josas France**

Esther Borrás Noguès, Camille Kropp, Laureline Bétemps, Cassiana de Sousa, Florian Chain, Sandrine Auger, Philippe Langella and Jean-Marc Chatel

**Federal University of Minas Gerais, Institute of Biological Sciences, Belo-Horizonte, MG, Brazil**

Cassiana de Sousa and Vasco Azevedo

## **Contributions**

E.BN. performed the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript, C.K., L.B., C.dS. and F.C. participated in the experiments, S.A. participated in the analysis, J-M.C. corrected the manuscript and supervised the experiments, J-M.C. and P.L. conceived the study.

**Corresponding author** jean-marc.chatel@inrae.fr

## **Funding**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - CAPES-COFECUB 720/11.

## **Conflicts of interests/Competing interests**

The authors declare no conflicts of interests

## **Ethics approval**

This study was carried out in accordance with the guidelines of the local ethics committee.

## **Data availability and materials**

<https://data.inrae.fr/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.15454/CJ2600>

## Figures legends

**Fig. 1 Effect of DNBS injection on weight loss and macroscopic score on experimental groups receiving recombinant *L.lactis* or not.** A) Experimental protocol for the DNBS-induced model of colitis in mice. Effects of LL-Probi-H1-empty, LL-Probi-H1-hCAP18, LL-pSEC:empty and LL-pSEC:hCAP18 on recovery from DNBS with respect to B) body weight and C) macroscopic score. Data represent mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001, n = 24 mice per group for LL-Probi-H1:empty and LL-Probi-H1:hCAP18, n = 16 for LL-pSEC:empty and LL-pSEC:hCAP18, n = 20 mice for healthy control.

**Fig. 2 Effects of preventive treatment on DNBS-induced tissue damage and inflammation.** Assessments of A) bowel thickness, B) bowel length, C) MPO activity, and D) lipocalin in feces in control groups (PBS-glycerol, DNBS) and treatment groups (LL-Probi-H1:empty, LL-Probi-H1:hCAP18, LL-pSEC:empty, LL-pSEC:hCAP18). Data represent mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001, n = n = 24 mice per group for LL-Probi-H1:empty and LL-Probi-H1:hCAP18, n = 16 for LL-pSEC:empty and LL-pSEC:hCAP18, n = 20 mice for healthy control.

**Fig. 3 Cytokine concentrations in mesenteric lymph node supernatants.** Cytokine secretion by mesenteric lymph node cells was induced with PMA ionomycin (A1, B1, C1) or CD3+/CD28+ (A2, B2, C2), A=IL-10, B=IL-17A, C=IFN- $\gamma$ . Data represent mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001, n = 16 mice per group

**Fig. 4 Analysis of the composition of fecal microbiota by 16S sequencing after 7 days of gavage.** A) Composition of samples by phylum. B) Principal coordinates analysis of different treatment groups. C) Differentially abundant taxa between untreated and LL-probi-H1:hCAP18 groups and D) untreated and LL-probi-H1:empty groups, according to DESeq2. Untreated control group n = 16, LL-Probi-H1:hCAP18 n = 7, LL-Probi-H1:empty n = 8

**Fig. 5 Effect on DNBS-induced colitis of fecal transplant from donor mice that were gavaged with LL-Probi-H1:empty or LL-Probi-H1:hCAP18.** A) Experimental protocol of PEG washing and fecal transplant. B) Mouse weight loss. C) Colon thickness. D) Macroscopic score. E) MPO activity. Data represent mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001, n = 8 mice per group

## Tables

**Table S1: PERMANOVA of samples by treatment**

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
treatment	2	0.25595	0.127974	1.8079	0.11437	0.005 **
Residuals	28	1.98198	0.070785		0.88563	
Total	30	2.23793			1.00000	

**Table S2: PERMANOVA of samples by macroscopic score**

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
macroscopic_score	5	0.37771	0.075542	1.0152	0.16878	0.415
Residuals	25	1.86022	0.074409		0.83122	
Total	30	2.23793			1.00000	

**Table S3: Differential abundance results contrasting No treatment, LL-probi-H1:hCAP and LL-probi-H1:empty mice**

No treatment/LL-probi-H1:hCAP18

	Cluster	Level	log2foldchange	p-value
<i>Muribaculaceae</i>	Cluster_116	Family	1.32404293589324	1.6570409959217e-06
<i>Muribaculaceae</i>	Cluster_55	Family	1.14388973387858	3.40234461679945e-06
<i>Parasutterella</i>	Cluster_11	Genus	1.4503773082355	5.2549085927291e-05
<i>Peptostreptococcaceae</i>	Cluster_141	Family	2.66339496154198	9.38065654201224e-05
<i>Clostridia UCG-014</i>	Cluster_158	Order	1.75387106026085	0.000151874773353639
<i>Ruminococcaceae UCG-010</i>	Cluster_475	Family	2.29449509395752	0.00019590949751841
<i>Muribaculaceae</i>	Cluster_38	Family	0.857144634741257	0.00043322197031411
<i>Muribaculaceae</i>	Cluster_232	Family	1.20920112936848	0.00159431331890297
<i>Muribaculaceae</i>	Cluster_661	Family	1.17721968770559	0.00139246648114039
<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i>	Cluster_36	Genus	-4.64021961088753	0.0017318763725779

<i>Ruminococcaceae UBA1819</i>	Cluster_70	Genus	-2.00596554250594	0.00196514952988505
<i>Oscillibacter</i>	Cluster_273	Genus	-1.58415720227679	0.00153927737844786
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	Cluster_47	Genus	2.38624221560097	0.00197974019783422

No treatment/LL-probi-H1:empty

	<b>Cluster</b>	<b>Level</b>	<b>log2foldchange</b>	<b>p-value</b>
<i>Lachnospiraceae NK4A136</i> <i>group</i>	Cluster_139	Genus	-4.30165777892058	1.31001136762978e-05
<i>Lachnospiraceae bacterium</i> <i>595</i>	Cluster_255	Species	-5.52516890734503	1.87369438854964e-05
<i>Muribaculaceae</i>	Cluster_116	Family	1.06318828641114	8.75680777001193e-05
<i>Clostridia UCG-014</i>	Cluster_49	Order	2.43677858700927	0.000109045286356505
<i>Ruminococcaceae UCG-010</i>	Cluster_845	Family	3.30039065167253	0.000279936091093825
<i>Lachnospiraceae NK4A136</i> <i>group</i>	Cluster_944	Genus	-4.60791171917626	0.000421624171382098

---



\* Group is significantly different from Healthy control  
 \* Group is significantly different from DNBS control

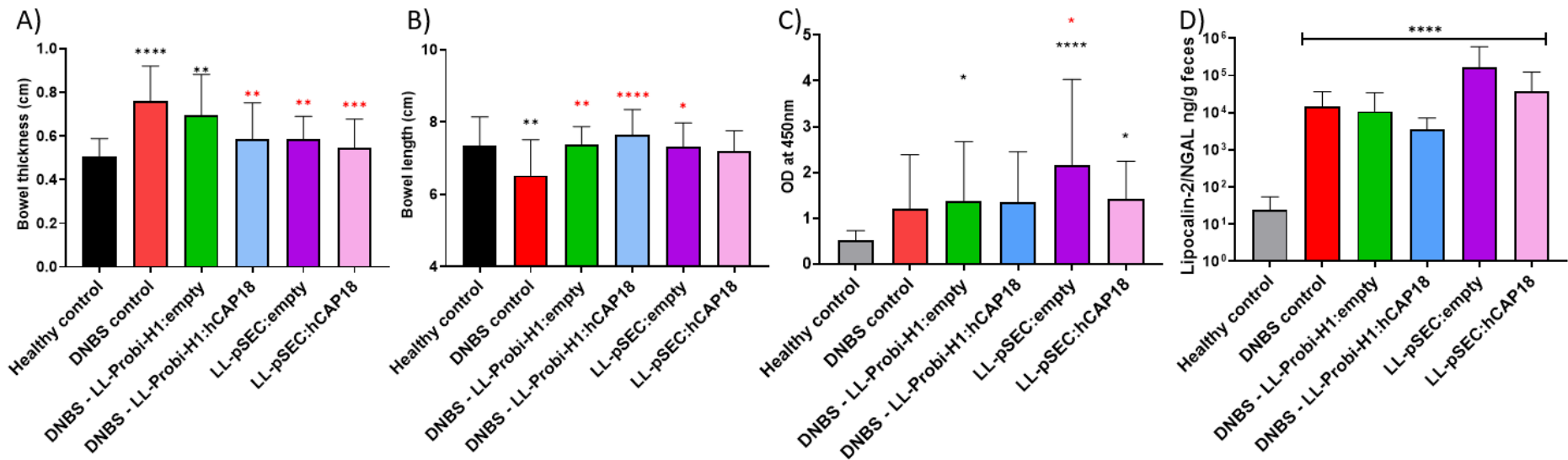


Figure 2

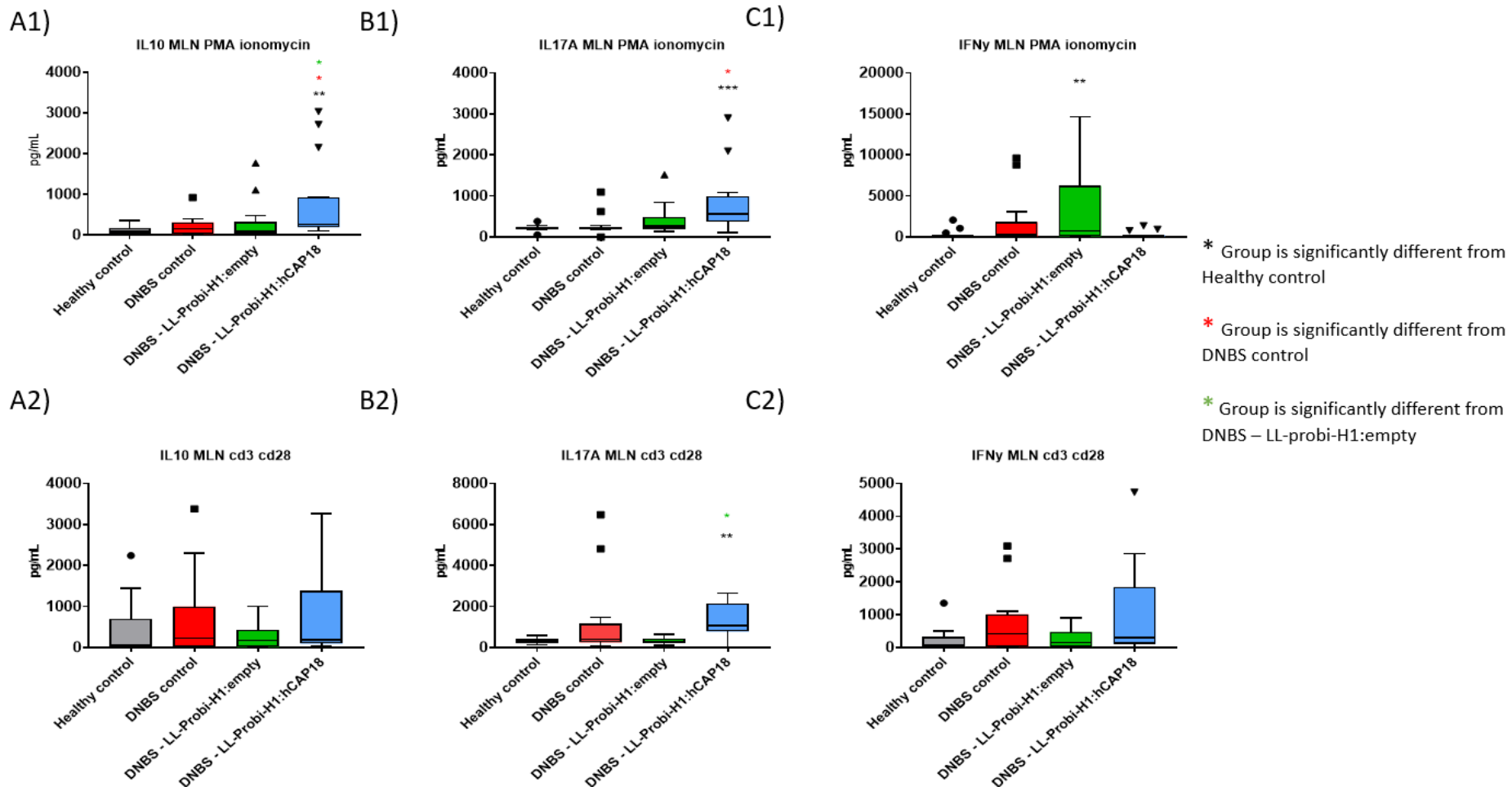


Figure 3

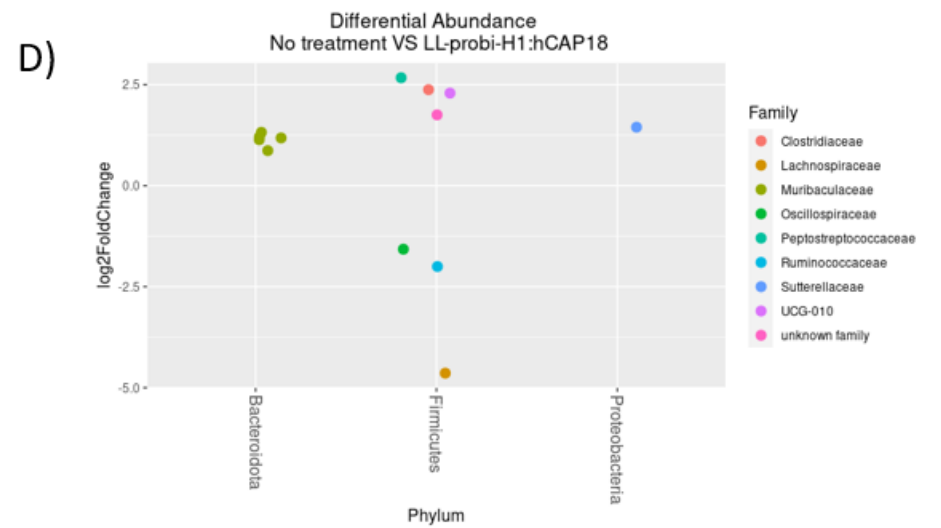
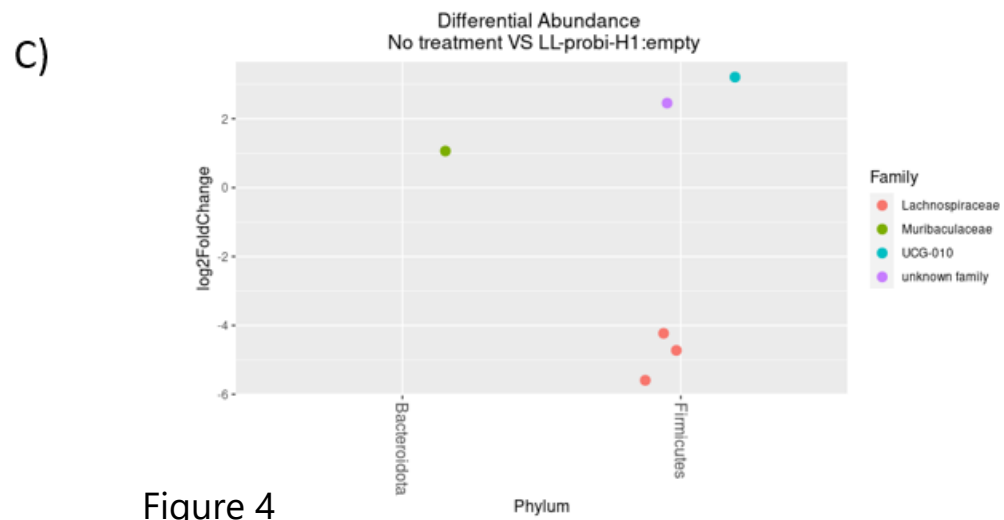
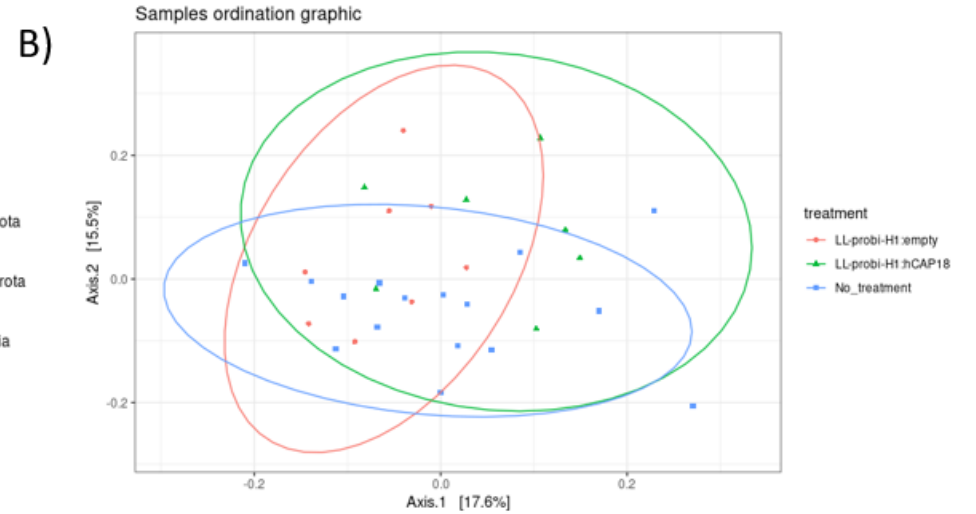
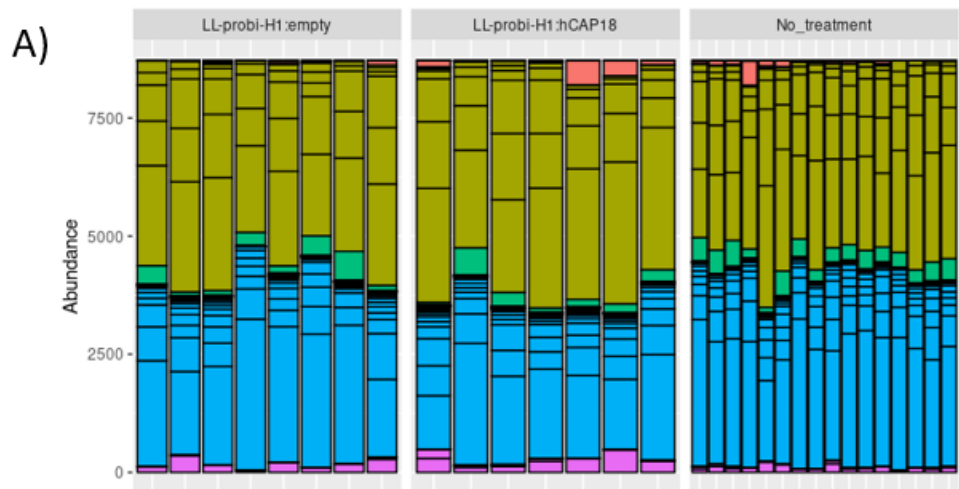


Figure 4



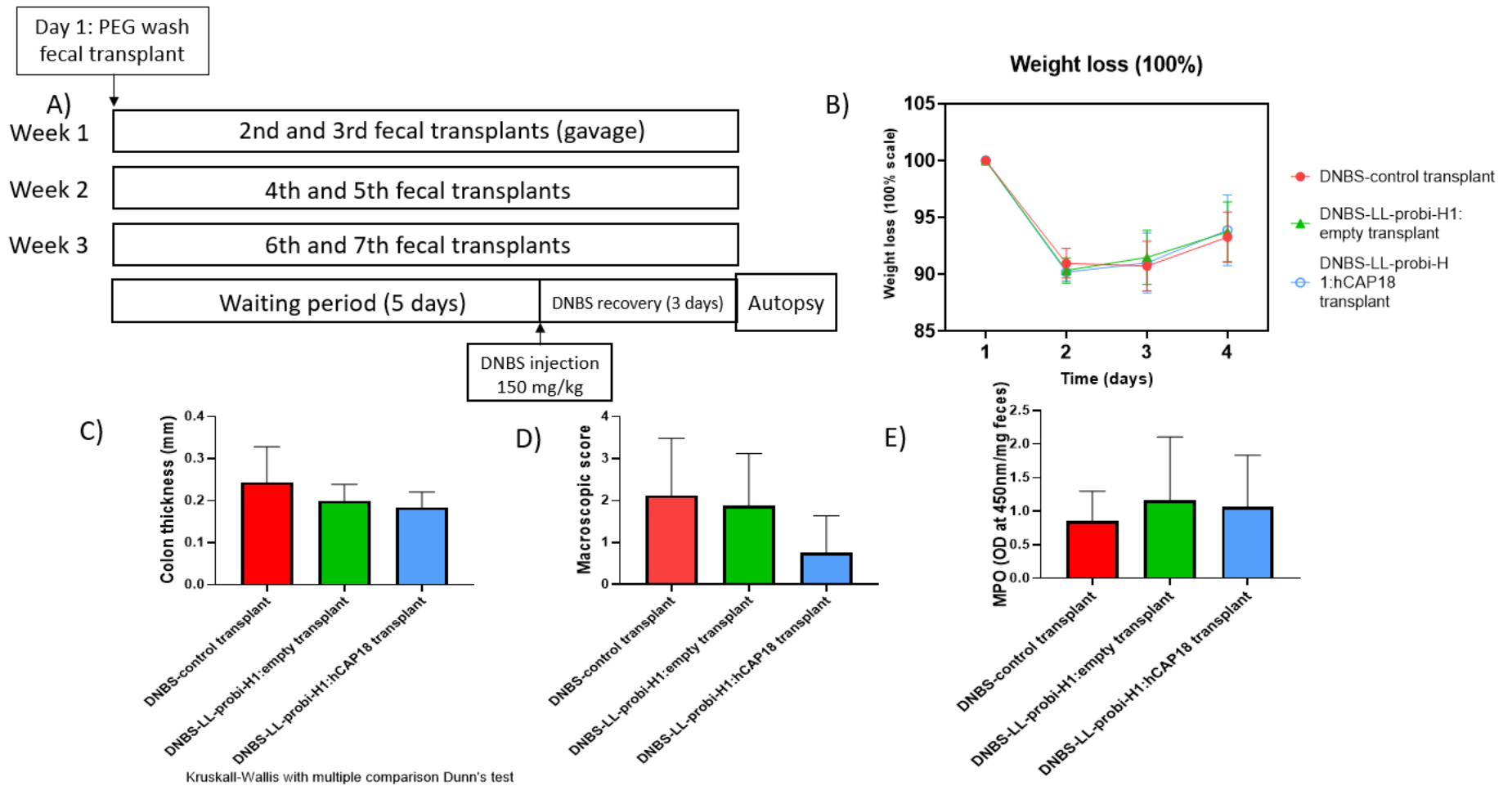


Figure 5

**Chapitre 2 : REG3A et IL22 ont des effets opposés sur l'accumulation des lipides dans le foie dans un modèle d'obésité induite par régime surgras**



# **REG3A and IL22 have opposite effects on fat accumulation in the liver in a milk-fat based high-fat diet and impact gut microbiota composition**

Esther Borrás Nogues<sup>1</sup>, Alisson Agus<sup>1</sup>, Aurélie Bruneau<sup>1</sup>, Florian Chain<sup>1</sup>, Léa Graci<sup>2</sup>, Philippe Langella<sup>1</sup> and Jean-Marc Chatel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR1319, MICALIS, 78352 Jouy en Josas France

<sup>2</sup> ESTBB - Ecole Supérieure de Biologie - Biochimie - Biotechnologies

**Corresponding author** jean-marc.chatel@inrae.fr

## **Abstract**

IL22 is a cytokine with many immunoregulatory effects. It also promotes mucus production, cell proliferation and wound healing, making it a key component of intestinal health. An increasing body of studies highlight the potential of IL22 as a therapeutic drug against NAFLD through the induction of antimicrobial peptides, especially of the Reg3 lectins family, and the regulation of gut microbiota. However, adverse reactions to this molecule in long term administration are little-studied. In this study we provide evidence that daily long term administration of IL22 can aggravate NAFLD by mechanisms independent from gut microbiota.

## **Background**

The consumption of high quantity of sugar and fat in western diet leads to an increased prevalence of obesity. Such diets were shown to modulate the intestinal microbiota in patients and induce chronic low-grade inflammation, which participates in the pathogenesis of the metabolic syndrome. Epidemiological data show that obesity leads to an increased risk of developing Inflammatory Bowel Diseases (IBD). These results were replicated in mice; in laboratory conditions, high-fat diets exacerbate colitis in chemically induced and spontaneous models. The immune system response to fat in the gut and consequent modulation of the gut microbiota through different mechanisms of action have a causal link with the development of metabolic disorder as shown in an experiment which resulted in increased insulin sensitivity in patients receiving intestinal microbiota transfer from lean donors[1]. Interplay between gut microbiota, their metabolites and inflammatory markers modulate the development of Non-Alcoholic Fatty Liver disease (NAFLD). Furthermore, the administration of probiotics improve

inflammatory markers in NAFLD patients[2]. In mice model, microbiota transplant from obese donor to lean recipient induces obesity[3].

REG3A (and its murine homolog Reg3 $\gamma$ ) is an antimicrobial peptide (AMP) critical to gut homeostasis as it maintains the spatial segregation of bacteria and host cells in the gut[4]. REG3A's role in obesity is still highly debated. In mice, the production of Reg3 $\gamma$  by Paneth cells is reduced after 12 weeks of high-fat diet[5]. It should be noted that microbial shift precedes AMPs downregulation and both precede circulating inflammatory cytokines levels alterations, which suggests that AMPs expression in obesity is not the initial cause of microbial shift but might play a role in maintaining dysbiosis and establishing chronic inflammation in obese patients[5]. Another study found contradictory results and showed that overexpression of Reg3 $\gamma$  spontaneously leads to increased weight under normal diet conditions[6]. REG3A is induced in response to IL-22 and correlates with IL-22 levels in IBD patients[7].

IL-22 is an immunomodulatory cytokine whose induction is impaired in obese patients. It is a member of the IL-10 related cytokine family and its receptors are highly expressed in epithelial cells of the gastrointestinal tract. IL-22 signaling induces the production of antimicrobial peptides, such as the Reg3 lectins family, promotes cell proliferation and wound repair[8–10]. It also promotes mucins production through STAT3 activation. Its role in obesity and inflammation is still debated. While it has anti-inflammatory and wound repair effects in the gut, studies have found CD4+T cells from type 2 diabetes patients had increased production of IL-22 which in turn upregulated IL-1 $\beta$  production by adipose tissue macrophage and amplified inflammation[11]. The different pro or anti-inflammatory properties of IL-22 depends on its regulation by other factors such as IL-17A or IFN- $\gamma$ [8]. Nevertheless, numerous studies have found exogenous administration of IL-22 in leptin-deficient and HFD feed mice reverses many symptoms of the metabolic syndrome, suppresses ER stress and inflammation[12–14] although a 2015 study showed no effect of IL-22 administration or IL-22 genetic deletion on HFD-induced obesity and insulin resistance[15].

The microbiota has a strong impact on the development of the immune system and IL-22 production is lacking in germ-free mice. IL-22 in turn influences the composition of microbiota through its modulation of mucins and antimicrobial peptides[16,17]. IL-22 deficiency in mice is associated with reduced abundance of some bacterial genera such as Lactobacillus, Bacteroides and Ruminococcus[16].

Live bacteria have gained great interest as potential therapeutic vectors as they allow in situ production of molecules of interest. Multiple food grade bacteria have been developed as factories for the development of therapeutic proteins such as IL-2, IL-6[18] or IL-10 and have been demonstrated to be

biologically containable[19]. In 2020 J. Oh et al. found that administration of *Lactobacillus reuteri* expressing IL-22 reduced fatty liver disease in a high-fat diet mice experiment[20]. *L. lactis* MG1363 has also been genetically engineered with plasmid vectors using the cytomegalovirus promoter (pCMV) to deliver DNA vaccine to eukaryotic cells and induce production of the protein of interest in *in vitro* and *in vivo* assays[21–23]. Recently, the induction of IL-22 expression through intragastric administration of *L. lactis* engineered to deliver such a plasmid alleviated post infectious irritable bowel syndrome symptoms in mouse by restoring gut permeability, reduced colonic sensitivity and improved mice welfare[21].

In this study, we gave daily doses of recombinant *Lactococcus lactis* delivering DNA vaccine for REG3A and IL-22 production to mice fed with a butter-based high fat diet (milk-fat diet or MFD). We aim to compare the effects of REG3A and IL-22 expression by the epithelial cells on the development of obesity-related conditions and the composition of the microbiota. We show that they have opposite effects on fat accumulation in the liver and insulin resistance development despite inducing a similar shift in fecal microbiota composition.

## Material and Methods

### Mice breeding conditions and food

C57BL/6JRj mice were purchased from Janvier Labs and kept in compliance with the institutional and European Union guidelines for laboratory animal care. The study was approved by the COMETHEA ethics committee (n°2015070115416973). They were delivered at 6 weeks of age and co-housed by groups of four mice per cage in an air-conditioned room with controlled temperature and circadian cycle (12 h light, 12 h dark) in the Animal Facility of the National Institute of Agronomic and Environment Research.

After one week of acclimatization, mice were assigned to groups and fed either a low fat control diet (10.4% energy from fat; TD.120508, Purified Control (93M, Teklad VM), Envigo) or a milkfat diet (37.4% energy from fat; TD.97222, 18% Milkfat Diet, Envigo) *ad libitum* for 12 weeks during which mice weight and food intake were measured once a week. Experimental diets were treated with UV and stored at 4°C in airtight containers until use.

Mice were divided into five different groups (n=16 for each): low fat diet control (LFD), milkfat diet control (MFD), milkfat diet +  $10^9$  cfu LL-ProBi-H1:empty, milkfat diet +  $10^9$  cfu LL-ProBi-H1:REG3A or milkfat diet +  $10^9$  cfu LL-ProBi-H1:IL22. Bacteria were administered daily by intragastric gavage for the duration of the experiment (see figure 1A).

## IL-22 and REG3A expressing plasmids

LL-Probi-H1:empty carries the Probi-H1 plasmid which allows for expression of proteins of interest in eukaryotic cells under the control of pCMV as described by Meynier et al.[21]. REG3A and IL-22 sequences were cloned into the plasmid expression cassette which resulted in the Probi-H1:REG3A and Probi-H1:IL-22 plasmids. Plasmids were then inserted into *L. lactis* MG1363 which was used as the delivery vector for DNA transfer.

## Oral glucose tolerance test

Mice were fasted for 16 hours. Glucose was administered orally at 2g/kg and glycemia was measured at 0, 15, 30, 60 and 120 minutes after administration. For measurements, Accu-Chek Performa Nano blood glucose monitoring strips (Cat #06454011031) and Accu-Check Performa blood glucose meter (Roche Diabetes Care) were used. Blood was collected with EDTA-coated capillary tubes (Microvette® CB 300 K2E, Sarstedt), centrifuged for 10min at 1000g to isolate plasma and glucose-stimulated insulin concentration (GSIC) over time 0 to 30 minutes was measured with Rat/Mouse Insulin ELISA kit (EZRMI-13K, Sigma-Aldrich).

## Insulin tolerance test

Mice were fasted for 4 hours. Insulin was injected intraperitoneally (0.5 mU/g body weight) and glycemia was measured at 0, 15, 30, 60 and 120 minutes after administration. For measurements, Accu-Chek Performa Nano blood glucose monitoring strips (Cat #06454011031) and Accu-Check Performa blood glucose meter (Roche Diabetes Care) were used.

## Necropsy, tissue and blood sampling

Mice were euthanized by cervical dislocation. Blood was sampled from the mandibular vein before necropsy in Gel+Lithium Heparin tubes (Cat #812550, Kima) and subsequently centrifuged at for 10 min at 1000g to isolate plasma from red blood cells and stored at -80°C. Concentrations of triglycerides (TG), total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT) were determined at the Laboratoire de biochimie of Institut Claude Bernard with the Olympus AU400 Chemistry Analyzer. Tissues were removed and one piece was kept in RNA lysis buffer at room temperature for half a day then stored at -80°C, one piece was put in paraformaldehyde for histologic analysis and one piece was immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing.

## Liver histology and hepatic lipids measurement

A slice of the left lobe of the liver was sectioned and fixed in 4% PFA for 48h and transferred into 70% ethanol. It was then fixed in paraffin, trimmed, processed and cut into slices which were approximately 3  $\mu\text{m}$  thick, mounted on a glass slide and stained with H&E. Hepatic lipids were quantified blindly with the ImageJ software as described before[24].

## DNA extraction and 16S DNA sequencing

DNA was extracted using the protocol of Godon et al. [25]. DNA concentration and purity were determined using a NanoDrop instrument. We used the MTP™ Taq DNA Polymerase Kit (Sigma Cat#D7442-250UN) with 10 ng of extracted DNA for PCR amplification of the V3-V4 region of 16S rDNA. The amplification was performed with the primers MSQ-16SV3F (CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACGGRAGGCWGCAG) and MSQ-16SV4R (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT). PCR conditions were: 94°C for 1 minute; 30 cycles at 94°C for 1 minute, 65°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute; and a final extension of 72°C for 10 minutes. Amplification products were checked via electrophoresis on 2% agarose gel. Sequencing was performed using the Illumina Miseq (250x2 bp) system.

## Analysis of sequencing data

16S sequencing data were uploaded to the Galaxy platform [26,27] at <https://galaxy.migale.inra.fr/>. We used the FROGS pipeline to produce abundance tables of operational taxonomic units (OTUs). Denoising and clustering were performed with SWARM, chimera removal with VSEARCH, and affiliation with RDP Classifier using the 16S\_SILVA\_Pintail100\_138 database. OTUs with a minimum presence of 0.005% in all sequences were kept. OTUs were filtered for a minimum identity of 97% and a minimum coverage of 95%. Statistical analysis of results was performed using the phyloseq package on RStudio version 4.0.3. Measures of  $\alpha$ - (Observed, Chao1, ACE, Shannon and Inverse Simpson indexes) and  $\beta$ -diversity (Bray-Curtis and weighted UniFrac dissimilarity score) were calculated. Relative abundance table was written on rarefied data at the genus level. Analysis of differential expression was performed on raw data with the DESeq2 package at the genus and OTU levels.

## Statistical analysis

For data with a normal distribution, one-way ANOVA or two-way ANOVA was performed. Otherwise, Mann-Whitney analysis was performed. *p* values <0.05 were considered statistically significant.



## Results

### REG3A reduced weight gain in MFD-fed mice

Food intake was significantly increased in all groups fed with MFD except LL-Probi-H1:empty which eat significantly less (mean = 75,74kcal/mice/week) than control MFD mice (mean = 85,39; pval = 0,0138, figure 1B). We note that all groups who received recombinant *L. lactis* tended to have a lower food intake compared to the control group despite the lack of statistical significance (LL-Probi-H1:REG3A = 78.39, pval = 0,1305; LL-Probi-H1:IL-22 = 80,77, pval = 0,5133). Body weight gain was significantly reduced in LL-Probi-H1:REG3A group compared to MFD control group 11 weeks after the start of the experiment (pval=0.0228, figure 1C). Area under curve of body weight gain shows that REG3A significantly reduces body weight gain compared to *L. lactis* administration (pval = 0,0186, figure 1D).

### REG3A and IL-22 treatments alter insulin tolerance in different ways

Oral glucose tolerance test and insulin tolerance test were respectively performed at week 11 and week 10 (figure 1A). Blood glucose levels after 4 and 16h of fasting was not different between groups (Figure 2.A).

For OGTT, glycemia was slightly higher in MFD-fed groups compared to LFD control group but not significantly. Area under curve of OGTT measurements was significantly higher for mice who received *L. lactis* treatments (figure 2.B1). We found no significant difference in plasma insulin level between groups after 16h of fasting or 30 minutes after glucose stimulation. Because LFD group insulin fasting levels were abnormally high and variable, we cannot exclude contamination of our samples occurred (supplementary figure 1).

For ITT, we found no significant difference in glycemia between our groups (figure 2.C1). Area under curve of ITT measurements were higher in LL-Probi-H1:REG3A treated mice compared to MFD control group and lower in LL-Probi-H1:IL-22 treated mice compared to LL-Probi-H1:empty groups (figure 2.C2). 5 mice reached endpoint in the LFD group, 2 mice in the MFD control group, 2 mice in the LL-Probi-H1:REG3A group and 1 mouse in the IL-22 group. The LL-Probi-H1:empty group was the only one where all measurements could be done. Some mice showed signs of distress despite acceptable levels of blood glucose and ITT measurement had to be interrupted (figure 2.C3).

### IL-22 aggravates fat accumulation and damage in the liver of MFD-fed mice

Lipid accumulation (figure 3.A) was greatly increased in all MFD fed-mice (mean area of interest = 0,39) compared to LFD control (mean AOI = 0,05). Administration of *L. lactis* in itself significantly reduces fat

accumulation in the liver compared to MFD control (mean AOI = 0,29; pval = 0,0233). REG3A-treated mice have similarly lowered fat in the liver (mean AOI = 0,26; pval = 0,0016). IL-22 seems to completely reverse this effect and strongly increases fat accumulation in the liver compared to LL-Probi-H1:empty (mean AOI = 0,47; pval < 0,0001).

Plasma levels of alanine aminotransferase (ALAT) was increased significantly in all MFD-fed groups (pval : MFD = 0,0003; empty = 0,0126; IL-22 = 0,0222) compared to LFD but LL-Probi-H1:REG3A (pval = 0,07) (figure 3.B). We note that 3 outliers are present in the MFD control group (with ALAT levels at 157, 248 and 262U/L respectively) and one outlier in the IL-22 group (ALAT level at 291U/L). We chose to keep them in the analysis as they reflect physiological damage of the liver after long-term MFD feeding. We also performed a one-way ANOVA analysis after removing these outliers (data not shown) but it did not affect which groups were significantly different from each other. Aspartate aminotransferase (ASAT) did not significantly differ between groups but we note that the trends are similar with ALAT levels and outliers appearing on the graph correspond to the same mice.

On the contrary, triglyceride (TG) levels are significantly decreased in MFD control and LL-Probi-H1:IL22 groups compared to LFD control (figure 3.C). Cholesterol levels are significantly higher in all MFD-fed groups except for the control group due to 3 outliers which had abnormally low HDL and total cholesterol levels. We note that these outliers are the same mice which had extremely high ASAT (>200 U/L) and ALAT (>100 U/L) plasma levels (figure 3.B) and suppose their cholesterol levels crashed down due to liver failure. One mice from the LL-Probi-H1:IL22 group had similarly low cholesterol levels and very high ASAT and ALAT levels. Removal of these mice from the statistical analysis changes the significance level against LFD control (LFD against MFD pval = 0,001 after removal of the 3 outliers). HDL levels trends coincide with total cholesterol levels although LL-Probi-H1:REG3A-treated mice have significantly higher HDL than MFD mice when all mice are included in the analysis (figure 3.C). If outliers are removed, this difference disappears and all MFD-fed mice have significantly higher HDL levels than LFD-fed mice.

### MFD reduces fecal microbiota richness

We investigated the composition of fecal microbiota after 12 weeks of MFD and treatment. We obtained a total of 2,121,530 sequences with an average of  $53038 \pm 19205$  reads per sample. One sample was removed from the final analysis due to insufficient sequences count (9861 total reads and <100 OTU sequenced). A total of 341 OTUs were detected. 5 phyla (32 families and 70 genera) were represented in our samples: Bacteroidota, Firmicutes, Desulfobacterota, Proteobacteria and Actinobacteria (figure 4.A).

There was a great loss of OTU richness in MFD-fed mice compared to LFD, especially in the low abundance OTUs as can be seen on the heatmap (figure 4.B) and alpha-diversity tests (observed, Chao1 and ACE indexes  $pval < 0,01$ , figure 4.C). At the genus level there is no significant loss of alpha-diversity between groups except for mice treated with LL-Probi-H1:REG3A (Shannon index, fig. S1). We note that Probi-H1:REG3A-treated mice had less variability in richness between samples than other groups (fig. 4C). Intra-variability was not significantly impacted (Shannon and Inverse Simpson indexes). No significant difference in alpha-diversity was observed between MFD-fed treated and untreated mice.

### Gut microbiota composition correlates with diet, *L. lactis* treatment and liver damage at OTU and genus levels

Principal component analysis on the OTUs showed that diet and supplementation with LL-Probi-H1:empty, LL-Probi-H1:REG3A and LL-Probi-H1:IL22 were impactful on gut community composition (figure 5). Each group treatment clusterises separately from the others except the LL-Probi-H1:REG3A and LL-Probi-H1:IL22 groups which seem to clusterise together. PERMANOVA analysis on Bray-Curtis and weighted UniFrac distances show statistically significant differences at the OTU level depending on diet (Bray-Curtis :  $R2 = 0,11534$ ;  $pval < 0,001$  – wUniFrac :  $R2 = 0,06152$ ,  $pval = 0,045$ ), treatment (Bray-Curtis :  $R2 = 0,19302$ ;  $pval < 0,001$  – wUniFrac :  $R2 = 0,14069$ ,  $pval = 0,035$ ) and ALAT in blood plasma (Bray-Curtis :  $R2 = 0,05032$ ;  $pval < 0,001$  – wUniFrac :  $R2 = 0,06861$ ,  $pval = 0,029$ ; see Table 1).

At the genus level, we see a similar distribution of samples depending on group treatment (fig. 6). PERMANOVA analysis on Bray-Curtis and weighted UniFrac distances shows a statistically different genus composition depending on diet (Bray-Curtis :  $R2 = 0,11067$ ;  $pval < 0,001$ ), treatment (Bray-Curtis :  $R2 = 0,20008$ ;  $pval < 0,001$  – wUniFrac :  $R2 = 0,13649$ ,  $pval = 0,046$ ) and ALAT in blood plasma (Bray-Curtis :  $R2 = 0,05623$ ;  $pval < 0,009$ – wUniFrac :  $R2 = 0,07205$ ,  $pval = 0,038$ ; see Table 2).

### REG3A and IL-22 reverse *Alistipes* and *Muribaculum* increase due to MFD

From LFD to MFD control we see a strong relative increase of many genus among which some are significant such as *Muribaculaceae* (from 14,72% to 22,05%), *Rikenellaceae* (*Alistipes* went from 14,48% to 18,85% and *Rikenellaceae RC9 gut group* went from 0,42% to 1,44%), [*Eubacterium*] coprostanoligenes group, *Oscillospiraceae* NK4A214 group and *Tyzzarella*. Decreasing taxa include *Alloprevotella* (albeit non significantly but went from 12,78% to 4,36%, figure 6.A, detailed in supplementary table 1), *Parabacteroides* (from 4,93% to 1,92%), *Erysipelotrichaceae*, *Clostridia* UCG-014, *Anaerovoracaceae*, many *Lachnospiraceae* (*Lachnospiraceae* FCS020 group, *Ruminococcaceae* UBA1819, *Ruminiclostridium*, *Oscillospiraceae* UCG-003, [*Eubacterium*] *xylanophilum* group, and *Blautia*) and *Enterococcus* (Figure 6B,

detailed in supplementary table 2). At the OTU level (figure 6.C, detailed in supplementary table 3) 32 taxa are significantly increased (18 Firmicutes and 13 Bacteroidota) and 21 taxa are significantly decreased (all of which belong to the phylum Firmicutes). OTUs increased include 10 *Muribaculaceae* (including *Muribaculum*), 9 *Lachnospiraceae* (including *Tyzzarella*), 2 *Ruminococcaceae*, 7 *Oscillospiraceae*, 2 *Alistipes*, 1 *Rikenellaceae RC9 gut group* and 1 *Prevotellaceae UCG-001*. OTUs decreased include 4 *Clostridia UCG-014*, 12 *Lachnospiraceae*, 2 *Oscillospiraceae*, 1 *Clostridia vadinBB60 group*, 1 *Ruminococcaceae* and 1 *Ruminiclostridium*.

*L. lactis* administration is detectable in feces by sequencing. It increases *Ruminococcaceae UBA1819*, *Bacteroides* and *[Eubacterium] coprostanoligenes* group but decreases *Enterococcus* (Figure 6B). At the OTU level 17 taxa are significantly decreased (12 Firmicutes and 5 Bacteroidetes) and 7 are increased (5 Firmicutes and 2 Bacteroidota). Among the decreased OTU we find 2 *Clostridia vadinBB60 group*, 2 *Clostridia UCG-014*, 5 *Lachnospiraceae*, 4 *Muribaculaceae*, 2 *Oscillospiraceae*, 1 *Faecalibaculum* and 1 *Alistipes* (figure 6). Most of these differentially expressed OTU have a low baseline of expression (<100 mean reads). Hence, *Alistipes* is globally increased (but non-significantly) in this group compared to MFD control (24,42% against 18,85%, table 3) even if the only OTU to be differentially expressed by itself is decreased.

REG3A and IL22 have similar effects on gut microbiota composition with a significant decrease of *Alistipes* (from 24,42% to respectively 10,91 and 9,98%) and *Muribaculum* (from 2% to 0,62% and 0,57%) and an increase in *Rikenellaceae RC9 gut group* (from 1,55% to 4,02% and 10% respectively), *Oscillospiraceae UCG-003* and *Anaerotruncus* compared to LL-Probi-H1:empty. There was also an increase in total *Muribaculaceae* (from 14,73% in LL-probi-H1:empty to 20,67% in LL-Probi-H1:REG3A and 18,11% in LL-Probi-H1:IL22, see figure 6).

From LL-Probi-H1:empty to LL-Probi-H1:REG3A 9 OTUs are increased including 4 *Muribaculaceae*, 3 *Lachnospiraceae*, 1 *Clostridia vadinBB60* and 1 *Anaerotruncus*. 18 OTUs are decreased including 3 *Alistipes*, 3 *Oscillospiraceae*, 2 *Clostridia UCG-014*, 2 *Muribaculaceae* (including *Muribaculum*), 2 *Ruminococcaceae*, 2 *Lachnospiraceae*, 1 *Clostridia vadinBB60 group*, 1 *[Eubacterium] coprostanoligenes group*, 1 *Oscillospirales UCG-010* and 1 *Lactobacillus* (figure 6).

From LL-Probi-H1:empty to LL-Probi-H1:IL22 9 OTUs are increased including 3 *Muribaculaceae*, 2 *Lachnospiraceae*, 2 *Clostridia vadinBB60 group*, 1 *Rikenellaceae* and 1 *Clostridia UCG-014*. 8 OTUs are decreased including 6 *Alistipes*, 1 *Muribaculum* and 1 *[Eubacterium] coprostanoligenes group* (figure 6).

## Discussion

In this study we find that while administration of LL-Probi-H1:empty in itself positively impacts weight gain and hepatic steatosis, this treatment was associated with lower food intake and did not prevent elevation of liver damage markers in the blood, contrarily to LL-Probi-H1:REG3A administration. Moreover, weight gain was significantly lower in LL-Probi-H1:REG3A treated mice compared to LL-Probi-H1:empty mice despite similar food intake, suggesting that REG3A's effect is independent from the probiotic strain's effect and food intake. Interestingly, REG3A positive effects on hepatic steatosis are mitigated by elevated insulin resistance. This effect is not significant compared to LL-Probi-H1:empty. Reg3 lectins are generally found to be downregulated in the intestine of obese animals[28] and are protective against alcoholic steatohepatitis by reducing mucosa-associated microbiota and preventing bacterial translocation to the liver[29]. In 2018, S. Bluemel et al. found that Reg3b-deficient mice were protected against glucose intolerance but not liver disease in a Western-style fast food diet[30]. The lack of effect from Reg3 lectins on glucose metabolism dysregulations despite their proven protective effect on inflammation and NAFLD -which are directly linked to the development of insulin resistance[31,32]- is a discrepancy which needs further investigation.

Composition of the gut microbiota is a key component of Reg3 lectins benefits on health as they play a major role in the maintenance of the separation between commensal bacteria and the epithelium[4]. In our study we found that REG3A deeply impacted gut microbiota by strongly decreasing *Alistipes* and *Muribaculum* which were favored by MFD. IL22 treatment, which is known to induce Reg3 lectins[7], had very similar effects on gut microbiota composition. Hendrix et al. recently demonstrated that IL22 treatment improved NAFLD in wild-type mice, but not Reg3y<sup>-/-</sup>, which linked the benefits of this cytokine to antimicrobial peptide production and gut microbiota[33]. Furthermore Reg3 lectins decrease associated with IL22 and IL33 deficiency was correlated with *Alistipes* increase in previous studies[16,34] and IL22 deficient mice microbiota was found to be transferable and colitogenic.

Paradoxically, in our study, IL22 treatment had opposite effects in respect of REG3A. Steatohepatitis was undoubtedly aggravated in LL-Probi-H1:IL22-treated mice as shown by histological cuts and elevated plasma ALAT(fig. 3). Triglycerides were paradoxically downregulated, but such decrease has been previously observed in obese C57BL/6 mice and are thought to be due to either an increased triglyceride clearance or a suppression of triglycerides production by the liver[35]. One mice from the LL-Probi-H1:IL22 treated group had such extreme liver damage that cholesterol production was impaired (fig. 3). Despite this, these mice had significantly lower insulin tolerance compared to LL-Probi-H1:empty-treated mice. This last point seems coherent with multiple studies demonstrating the beneficial effects

of IL22 on insulin resistance[13,15]. Our findings directly contradict previous studies in which administration of *Lactobacillus reuteri* engineered to produce IL22 alleviated steatohepatitis through upregulation of Reg3 $\beta$  and Reg3 $\gamma$  in mice intestines and was linked to microbiota regulation and lower bacterial translocation to the liver[20,33]. This discrepancy can be explained by the difference in treatment time. Indeed, in our experiment, we started treatment with LL-Probi-H1:IL22 administration at the same time as diet shift while Oh J-H et al. waited a month after the start of high-fat diet before treatment with recombinant *L. reuteri* began. Furthermore, our system induces endogenous expression of IL22 by host cells while their approach is exogenous which probably affects dose-response and entry of the drug in the circulatory system.

IL22 promotes proliferation and regeneration of tissues and has anti-apoptotic effects, which is why it is generally considered as beneficial and is investigated as a promising drug for epithelial cell injury and alcoholic hepatitis[36]. However, in some cases, its sustained expression can lead to chronic inflammation and tissue damage, making it a double-edged sword[37]. Elevated IL22 expression in patients is correlated with incidence of type-2 diabetes mellitus[38] and this cytokine takes up pathological functions in chronic liver inflammation depending on the recruitment of Th17 cells[39]. Moreover IL22 amplifies IL1 $\beta$  expression in the adipose tissue which drives inflammation in NAFLD[11,40]. Although we did not test the microbiota of our treated mice by fecal transfer, it is possible that any benefit brought on by IL22 through microbiota regulation was overridden by pro-inflammatory mechanisms due to long-term overexpression of this cytokine. In the meantime, prudence is required while investigating the potential use of IL22 as a therapeutic drug.

## Acknowledgments

Colon tissues were sampled and fixed in paraformaldehyde solution and processed for paraffin embedding. Hematoxylin-eosin staining, paraffin embedding, sample section, and microscopy were performed at the histology facility of UMR 1313 GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France.

Sequencing was performed at the @BRIDGE facility at INRA Jouy-en-Josas using the Illumina Miseq (250x2 bp) system.

## Figures and tables legends

**Figure 1.** Effects of REG3A and IL22 on weight gain and food intake in mice. A) overview of the protocol. Mice were fed a milk-fat diet or low-fat diet and treated with or without recombinant *L. lactis* for over 12 weeks and sacrificed over the course of the 13th week. B) Food intake (shown as mean in kcal/mouse

per week) and C) weight development were controlled weekly. Body weight is represented as weight gain compared to first week. Significant differences were checked with repeated measure two-way ANOVA with multiple comparisons using Turkey's post-hoc test. Significance is shown against MFD control group. D) Area under curve of weight gain was calculated and significance was checked using one-way ANOVA with Turkey's post-hoc test. Data represent mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001. n = 16 mice per group.

**Figure 2.** Effects of REG3A and IL22 on glucose regulation of MFD-fed mice. A) Plasma glucose levels after 4 (A2) and 16h (A1) fasting at week 11 and 12 respectively. B) Blood glucose values during oral glucose tolerance test at week 11. C) Insulin tolerance test at week 12. Area under curve of glucose concentrations were calculated for OGTT and ITT (B2, C2). ITT interruption due to low glycemia is represented as a survival curve (C3). Significance was checked using one-way ANOVA with Turkey's post-hoc test. Data represent mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001. n = 16 mice per group.

**Figure 3.** Effects of REG3A and IL22 on A) hepatic fat accumulation, B) circulating transaminases levels and C) circulating cholesterol and fatty acids levels 12 weeks after HFD and treatment started. Significance was checked using one-way ANOVA with Turkey's post-hoc test when normality could be assumed or Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test otherwise. Data represent mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001. n = 16 mice per group for blood measurements and n= 8 mice per group for histological examination.

**Figure 4.** Milk-fat diet and recombinant *L.lactis* gavage effect on fecal microbiota. A) Bar plot of the relative abundances of the 5 most abundant phyla ranked by families. B) Heatmap of the 250 most abundant OTUs in samples. C) Alpha diversity at OTU level of samples by group represented in mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001. n = 8 mice per group. One mouse was removed from the analysis because of low OTU count compared to others (<10000).

**Figure 5.** Milk-fat diet and recombinant *L.lactis* gavage effect on fecal microbiota. Principal coordinate analysis of microbial communities at OTU level based on A) Bray-Curtis and B) weighted UniFrac dissimilarities.

**Figure 6.** Milk-fat diet and recombinant *L.lactis* gavage effect on fecal microbiota. A) relative abundance of the genera which are significantly increased or decreased between groups treated with *L.lactis* delivering plasmids for the expression of REG3A or IL22 and the empty *L. lactis* control group, represented in mean  $\pm$  SD. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001. n = 8 mice per group. B)

differentially expressed genera between groups expressed in log 2 fold change and C) Differentially expressed OTUs between groups expressed in log2 fold change

**Table 1** : PERMANOVA analysis on Bray-Curtis and weighted UniFrac distances testing the correlation of diet, treatment and transaminase levels with OTUs composition in fecal microbiota

**Table 2** : PERMANOVA analysis on Bray-Curtis and weighted UniFrac distances testing the correlation of diet, treatment and transaminase levels with genus composition in fecal microbiota

## Supplementary data

**Supplementary figure 1** : A) Fasting insulin levels in pM and B) area under the curve of glucose-stimulated insulin concentration. Data represent mean  $\pm$  SEM. No significant difference was observed. n= 16 mice per group.

**Supplementary table 1**: Differential analysis of each genus whose abundance changed significantly ( $p < 0,05$ ) between different groups

**Supplementary table 2**: Differential analysis of each OTU whose abundance changed significantly ( $p < 0,05$ ) between different groups

**Supplementary table 3**: Table of relative abundances of genera present in sample groups

## References

1. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2012;143.
2. Pan X, Wen SW, Kaminga AC, Liu A. Gut metabolites and inflammation factors in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Sci Reports* 2020 101 [Internet]. Nature Publishing Group; 2020 [cited 2022 Feb 8];10:1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-65051-8>
3. Ellekilde M, Selfjord E, Larsen CS, Jakesevic M, Rune I, Tranberg B, et al. Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2014;4.
4. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, et al. The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* (80- ) [Internet].



American Association for the Advancement of Science; 2011 [cited 2021 Nov 8];334:255–8. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1209791>

5. Guo X, Li J, Tang R, Zhang G, Zeng H, Wood RJ, et al. High Fat Diet Alters Gut Microbiota and the Expression of Paneth Cell-Antimicrobial Peptides Preceding Changes of Circulating Inflammatory Cytokines. *Mediators Inflamm* [Internet]. Hindawi Limited; 2017 [cited 2018 Oct 18];2017:9474896. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28316379>

6. Secq V, Mallmann C, Gironella M, Lopez B, Closa D, Garcia S, et al. PAP/HIP Protein Is an Obesogenic Factor. *J Cell Physiol* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2014 [cited 2018 Oct 19];229:225–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.24438>

7. Nagarkar D, Harder B, Deswal M, Orozco L, Ramamoorthi N, Loyet K, et al. REG3A is Induced in Response to IL-22 and Correlated with Peripheral IL-22 Levels in Subjects with Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. Elsevier BV; 2017;152:S965.

8. Mizoguchi A. Healing of intestinal inflammation by IL-22. *Inflamm. Bowel Dis*. NIH Public Access; 2012. p. 1777–84.

9. Tsuchida C, Sakuramoto-Tsuchida S, Taked M, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Misu M, et al. Expression of REG family genes in human inflammatory bowel diseases and its regulation. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2019 Jan 2];12:198–205. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580817301875?via%3Dihub>

10. Sabat R, Wolk K. Deciphering the role of interleukin-22 in metabolic alterations. *Cell Biosci*. BioMed Central Ltd.; 2015;5.

11. Dalmas E, Venteclef N, Caer C, Poitou C, Cremer I, Aron-Wisnewsky J, et al. T cell+derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ +driven inflammation in human adipose tissue: Relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. American Diabetes Association Inc.; 2014;63:1966–77.

12. Yang L, Zhang Y, Wang L, Fan F, Zhu L, Li Z, et al. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *J Hepatol* [Internet]. 2010 [cited 2020 Apr 10];53:339–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452699>

13. Wang X, Ota N, Manzanillo P, Kates L, Zavala-Solorio J, Eidschenk C, et al. Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2019 Jun 5];514:237–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature13564>

14. Hasnain SZ, Borg DJ, Harcourt BE, Tong H, Sheng YH, Ng CP, et al. Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2020 Apr 10];20:1417–26. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.3705>
15. Park O, Ki SH, Xu M, Wang H, Feng D, Tam J, et al. Biologically active, high levels of interleukin-22 inhibit hepatic gluconeogenesis but do not affect obesity and its metabolic consequences. *Cell Biosci* [Internet]. BioMed Central Ltd.; 2015 [cited 2020 Apr 10];5:25. Available from: <http://www.celandbioscience.com/content/5/1/25>
16. Zenewicz LA, Yin X, Wang G, Elinav E, Hao L, Zhao L, et al. IL-22 Deficiency Alters Colonic Microbiota To Be Transmissible and Colitogenic. *J Immunol*. The American Association of Immunologists; 2013;190:5306–12.
17. Zenewicz LA. IL-22: There Is a Gap in Our Knowledge. *ImmunoHorizons*. The American Association of Immunologists; 2018;2:198–207.
18. Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RWF, et al. Mucosal Delivery of Murine Interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by Recombinant Strains of *Lactococcus lactis* Coexpressing Antigen and Cytokine. *Infect Immun* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 1998 [cited 2022 Feb 8];66:3183. Available from: </pmc/articles/PMC108331/>
19. Steidler L, Neiryck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, et al. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 2003 217 [Internet]. Nature Publishing Group; 2003 [cited 2022 Feb 8];21:785–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt840>
20. Oh J-H, Schueler KL, Stapleton DS, Alexander LM, Yen C-LE, Keller MP, et al. Secretion of Recombinant Interleukin-22 by Engineered *Lactobacillus reuteri* Reduces Fatty Liver Disease in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity. *mSphere*. American Society for Microbiology; 2020;5.
21. Meynier M, Baudu E, Rolhion N, Defaye M, Straube M, Daugey V, et al. AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms. *Gut Microbes* [Internet]. *Gut Microbes*; 2022 [cited 2022 Feb 8];14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35090380/>
22. Souza BM, Preisser TM, Pereira VB, Zurita-Turk M, Castro CP, Cunha VP, et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal

- inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. *Microb Cell Fact* [Internet]. *Microb Cell Fact*; 2016 [cited 2022 Feb 8];15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27576902/>
23. Mancha-Agresti P, Drumond MM, Carmo FLR do, Santos MM, Santos JSC dos, Venanzi F, et al. A New Broad Range Plasmid for DNA Delivery in Eukaryotic Cells Using Lactic Acid Bacteria: In Vitro and In Vivo Assays. *Mol Ther Methods Clin Dev* [Internet]. American Society of Gene & Cell Therapy; 2017 [cited 2022 Feb 8];4:83. Available from: </pmc/articles/PMC5363290/>
24. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012 97 [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2022 Feb 9];9:671–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmeth.2089>
25. Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology; 1997 [cited 2020 Nov 13];63:2802–13. Available from: </pmc/articles/PMC168577/?report=abstract>
26. Afgan E, Baker D, Batut B, Van Den Beek M, Bouvier D, Ech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* [Internet]. Oxford University Press; 2018 [cited 2020 Nov 13];46:W537–44. Available from: <https://galaxyproject.org>
27. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* [Internet]. Oxford University Press; 2018 [cited 2020 Nov 16];34:1287–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29228191/>
28. Everard A, Geurts L, Caesar R, Van Hul M, Matamoros S, Duparc T, et al. Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status. *Nat Commun* 2014 51 [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2022 Feb 16];5:1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms6648>
29. Wang L, Fouts DE, Stärkel P, Hartmann P, Chen P, Llorente C, et al. Intestinal REG3 Lectins Protect against Alcoholic Steatohepatitis by Reducing Mucosa-Associated Microbiota and Preventing Bacterial Translocation. *Cell Host Microbe*. Cell Press; 2016;19:227–39.
30. Bluemel S, Wang L, Martino C, Lee S, Wang Y, Williams B, et al. The Role of Intestinal C-type Regenerating Islet Derived-3 Lectins for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun* [Internet]. John Wiley and Sons Inc; 2018 [cited 2022 Feb 16];2:393–406. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep4.1165>

31. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: An update. *Physiol Rev*. 2013;93:359–404.
32. Khan RS, Bril F, Cusi K, Newsome PN. Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2019 [cited 2022 Feb 16];70:711–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.30429>
33. Hendrikx T, Duan Y, Wang Y, Oh JH, Alexander LM, Huang W, et al. Bacteria engineered to produce IL-22 in intestine induce expression of REG3G to reduce ethanol-induced liver disease in mice. *Gut*. 2018;1–12.
34. Xiao Y, Huang X, Zhao Y, Chen F, Sun M, Yang W, et al. Interleukin-33 Promotes REG3 $\gamma$  Expression in Intestinal Epithelial Cells and Regulates Gut Microbiota. 2019 [cited 2022 Feb 21]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.02.006>
35. Guo J, Jou W, Gavrilova O, Hall KD. Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets. *PLoS One* [Internet]. PLoS One; 2009 [cited 2022 Feb 16];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19401758/>
36. Gao B, Xiang X. Interleukin-22 from bench to bedside: a promising drug for epithelial repair. *Cell Mol Immunol* 2018 167 [Internet]. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2022 Feb 16];16:666–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41423-018-0055-6>
37. Perusina Lanfranca M, Lin Y, Fang J, Zou W, Frankel T. Biological and Pathological Activities of Interleukin-22. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. NIH Public Access; 2016 [cited 2022 Feb 16];94:523. Available from: </pmc/articles/PMC4860114/>
38. Gong F, Wu J, Zhou P, Zhang M, Liu J, Liu Y, et al. Interleukin-22 Might Act as a Double-Edged Sword in Type 2 Diabetes and Coronary Artery Disease. *Mediators Inflamm* [Internet]. Hindawi Limited; 2016 [cited 2022 Feb 16];2016. Available from: </pmc/articles/PMC5088317/>
39. Zhao J, Zhang Z, Luan Y, Zou Z, Sun Y, Li Y, et al. Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. *Hepatology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2014 [cited 2022 Feb 16];59:1331–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.26916>

40. Mirea AM, Tack CJ, Chavakis T, Joosten LAB, Toonen EJM. IL-1 family cytokine pathways underlying NAFLD: towards new treatment strategies. *Trends Mol Med* [Internet]. Europe PMC Funders; 2018 [cited 2022 Feb 16];24:458. Available from: [/pmc/articles/PMC5939989/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)

Figures, tables and supplementary material

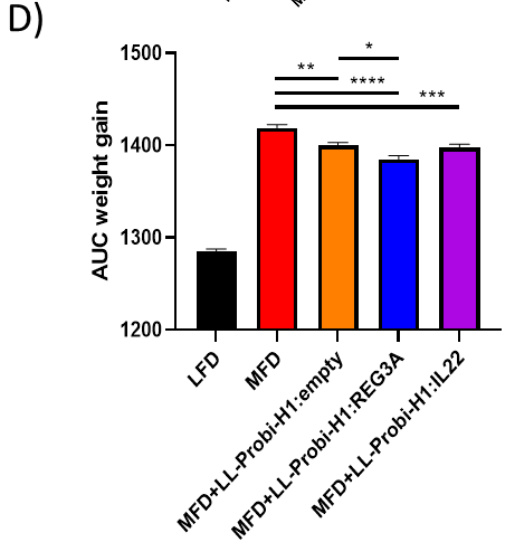
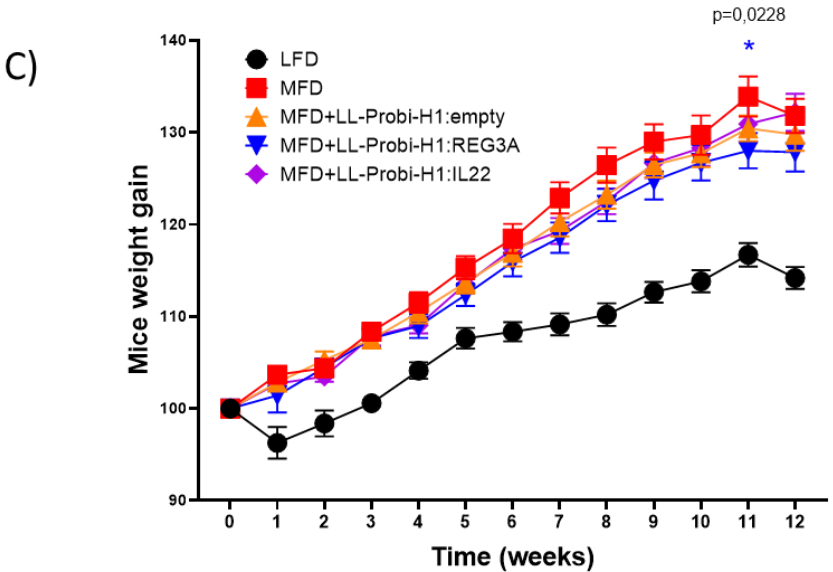
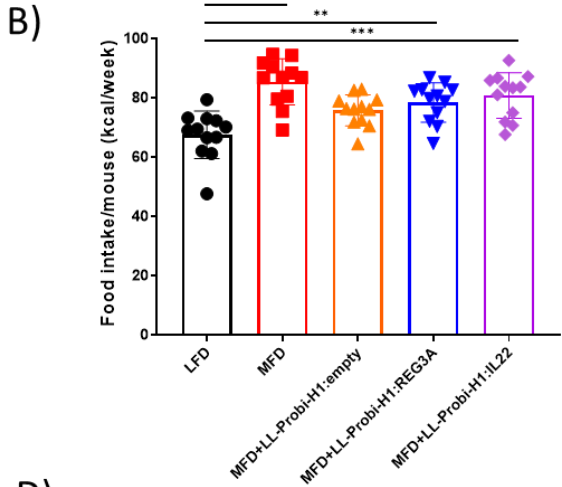
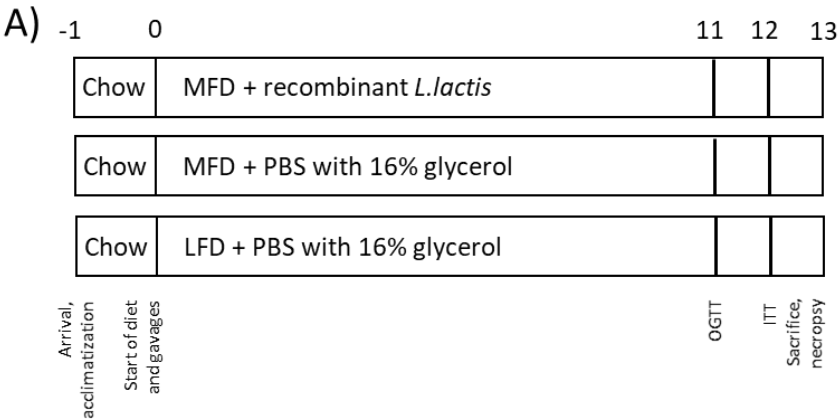


Figure 1

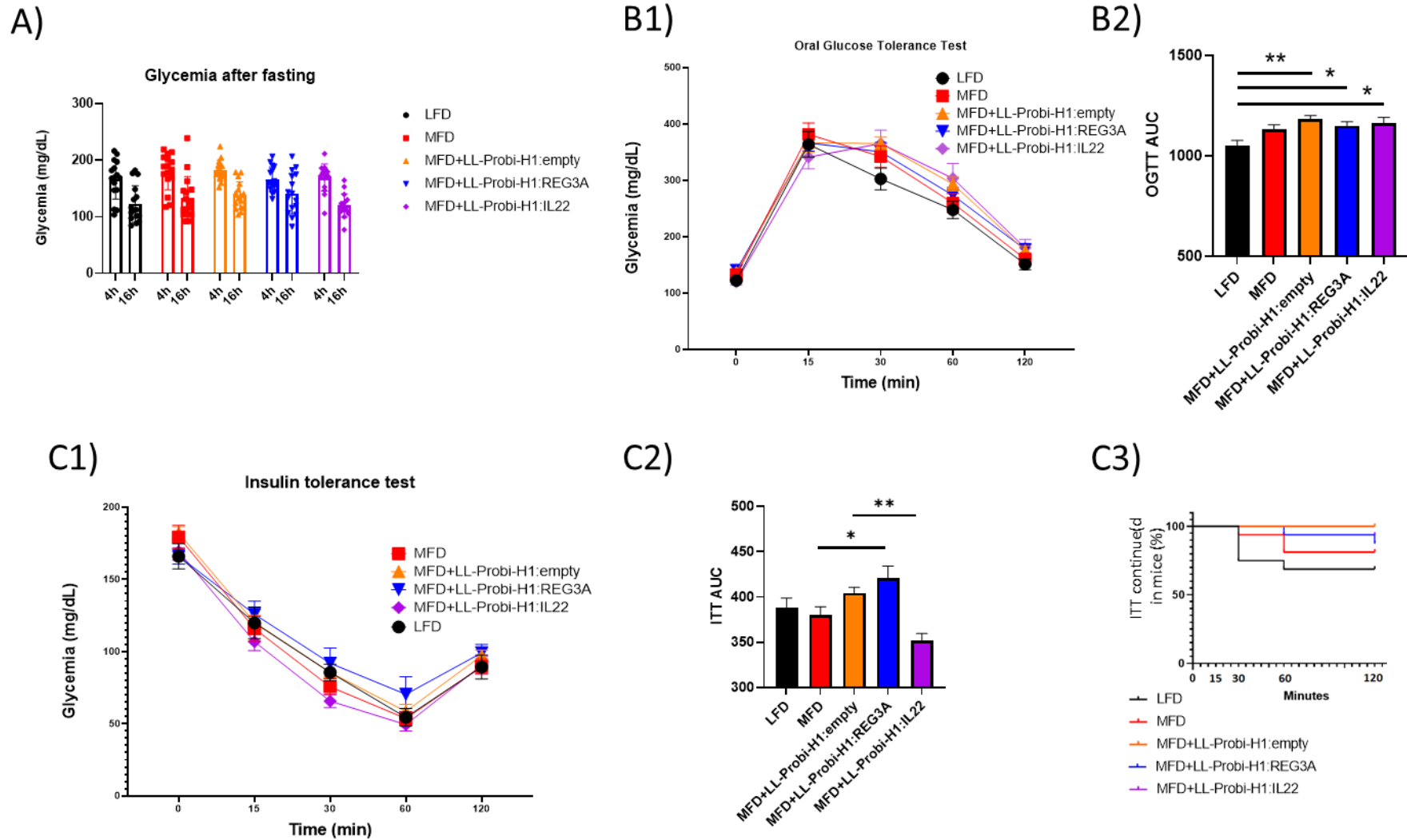


Figure 2

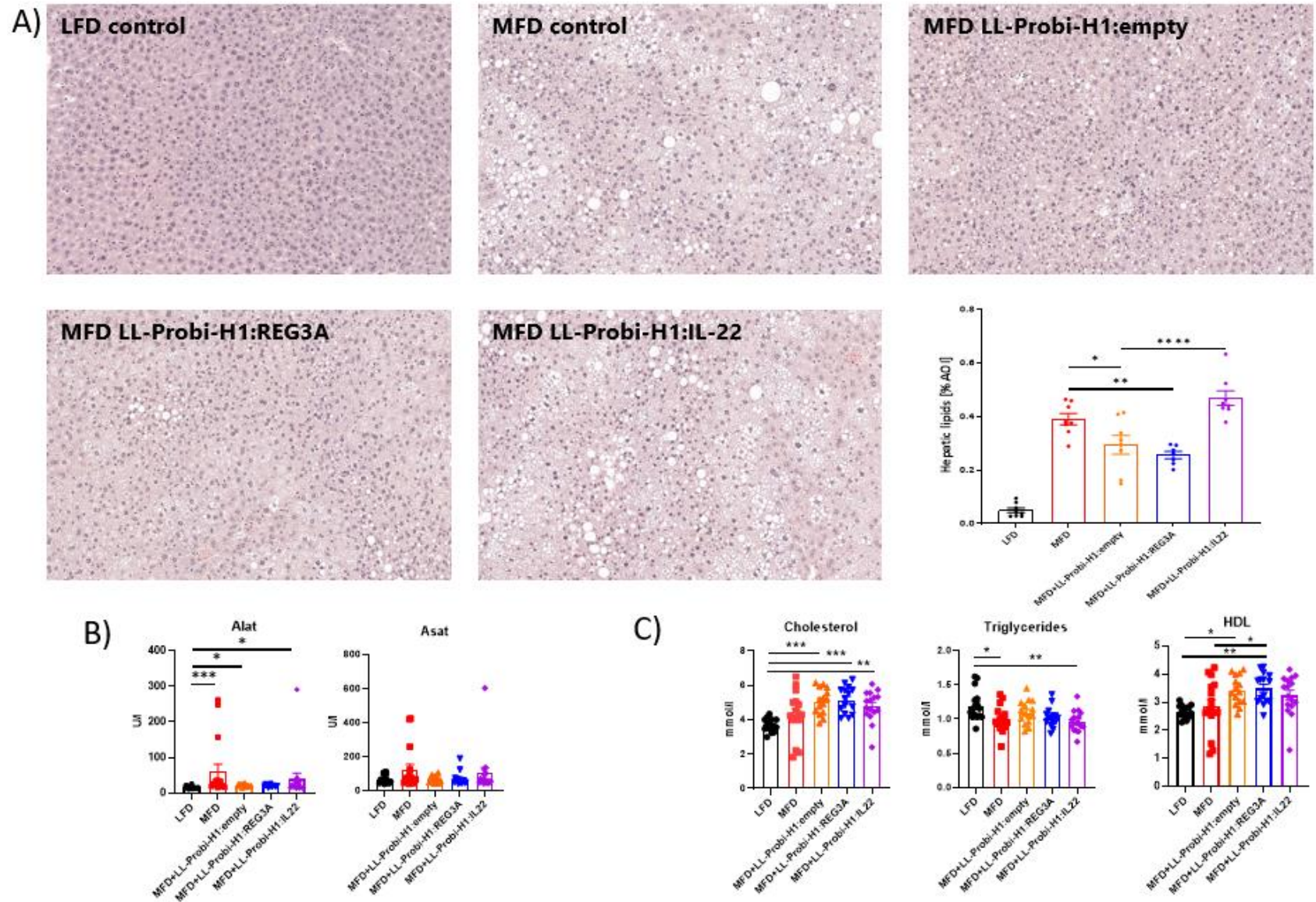


Figure 3



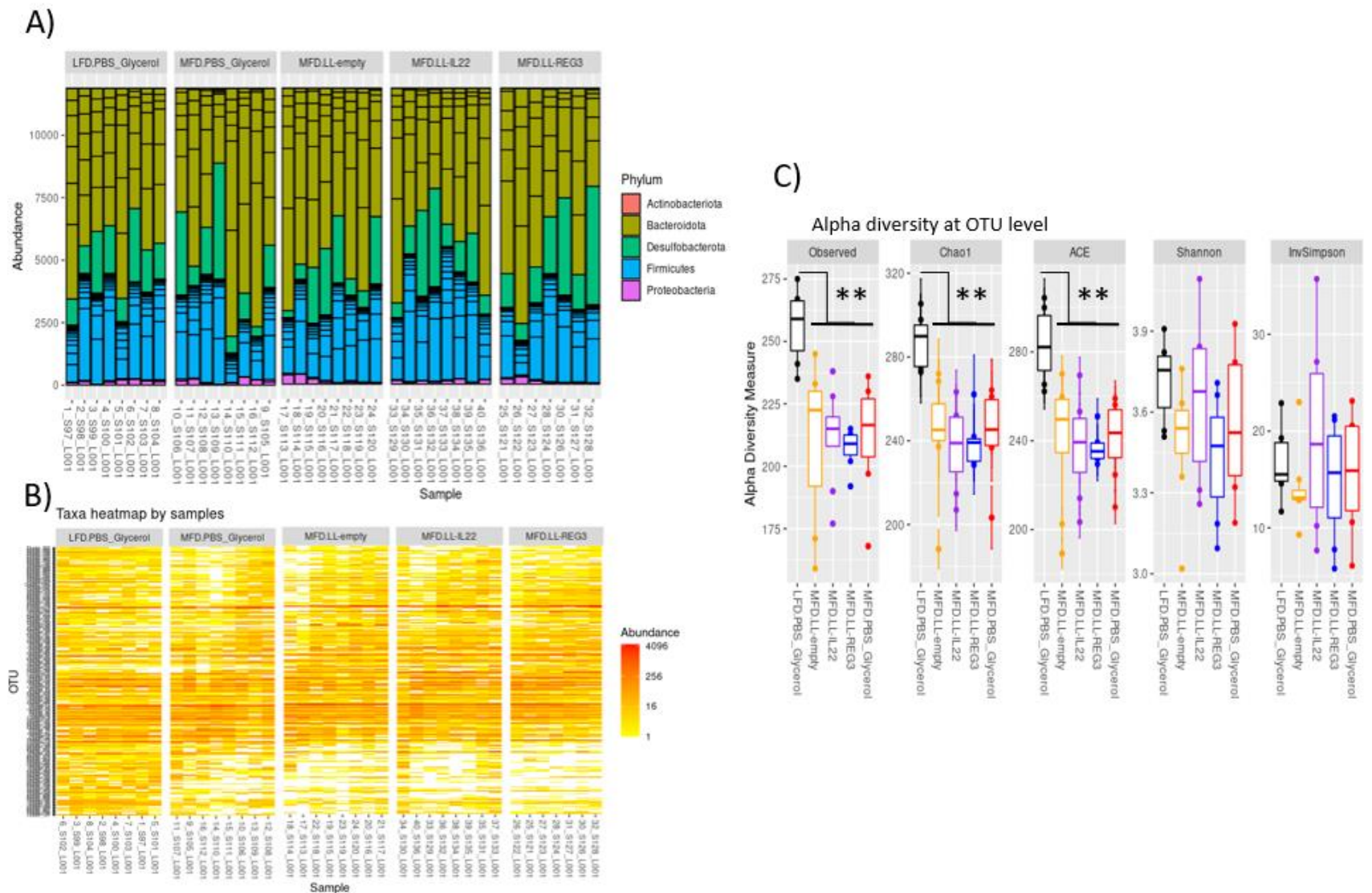
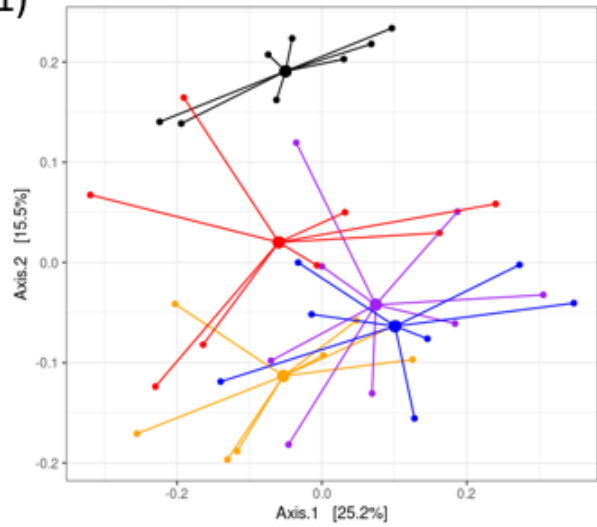
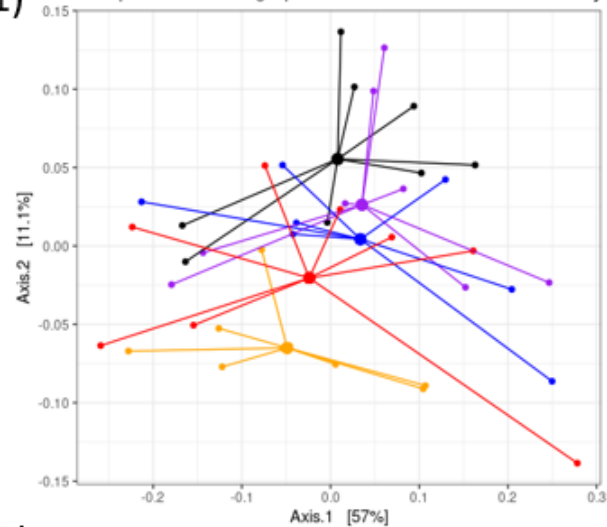


Figure 4

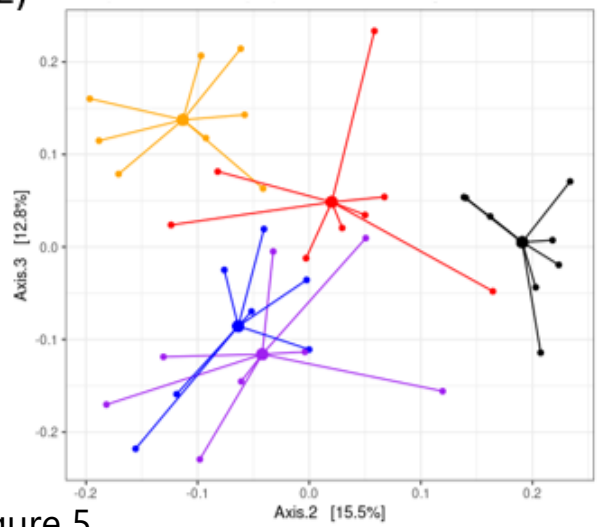
A1) Samples ordination graphic based on Bray-Burtis dissimilarity



B1) Samples ordination graphic based on wUnifrac dissimilarity



A2)



B2)

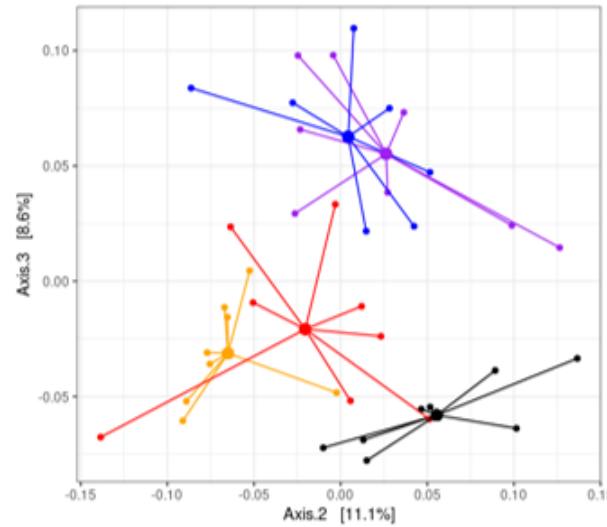


Figure 5

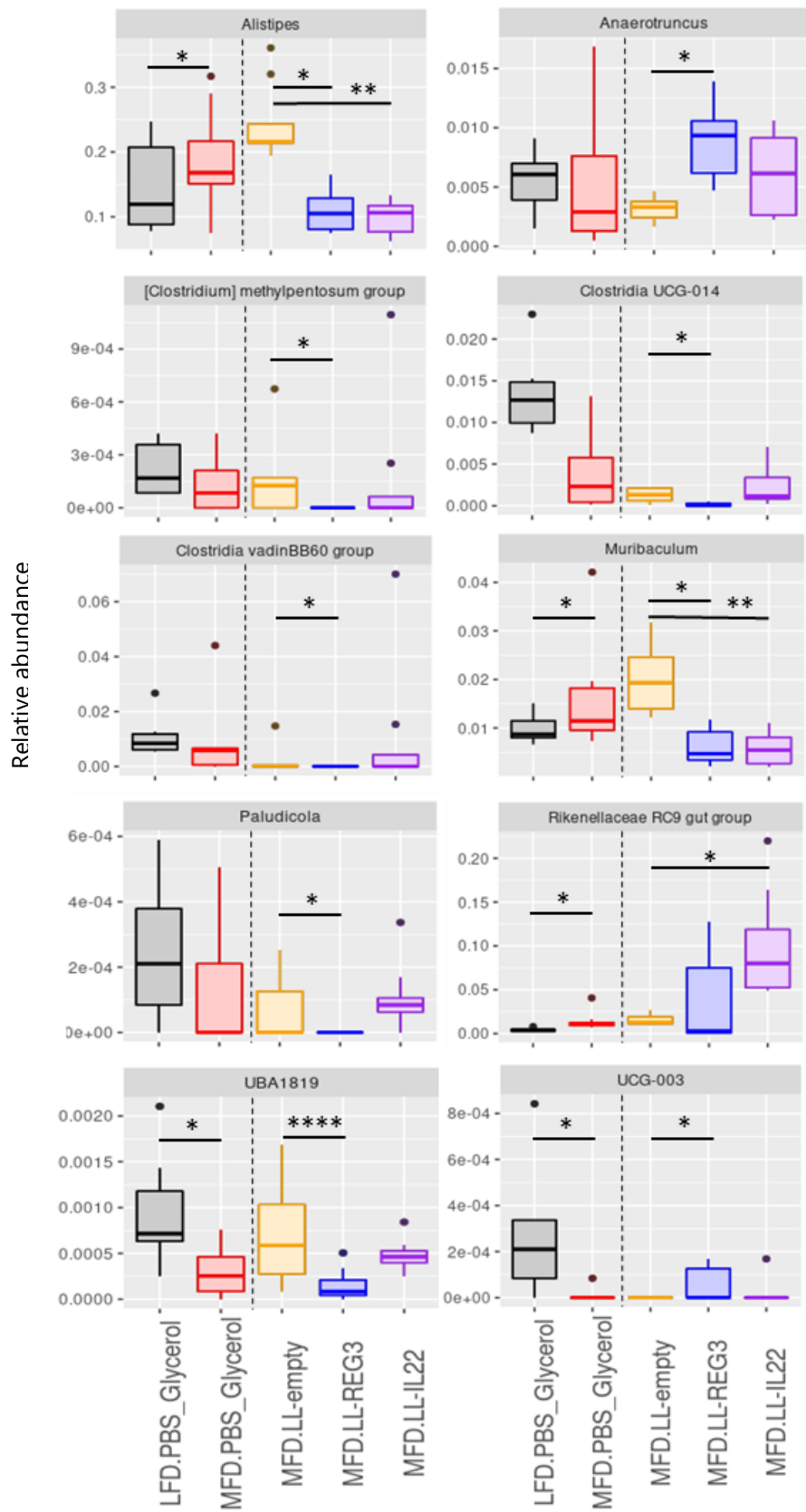


Figure 6A

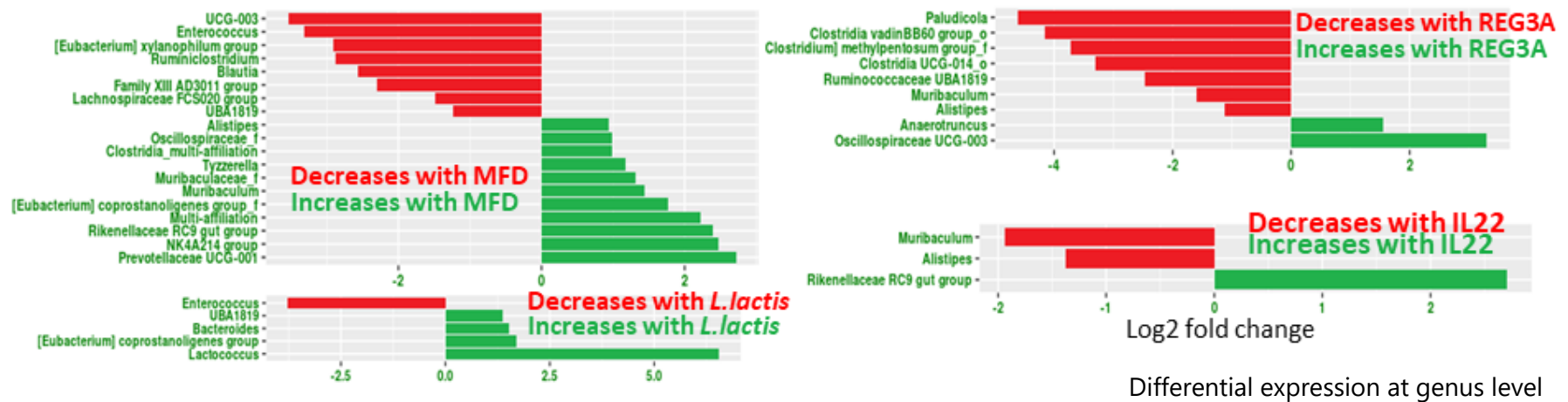
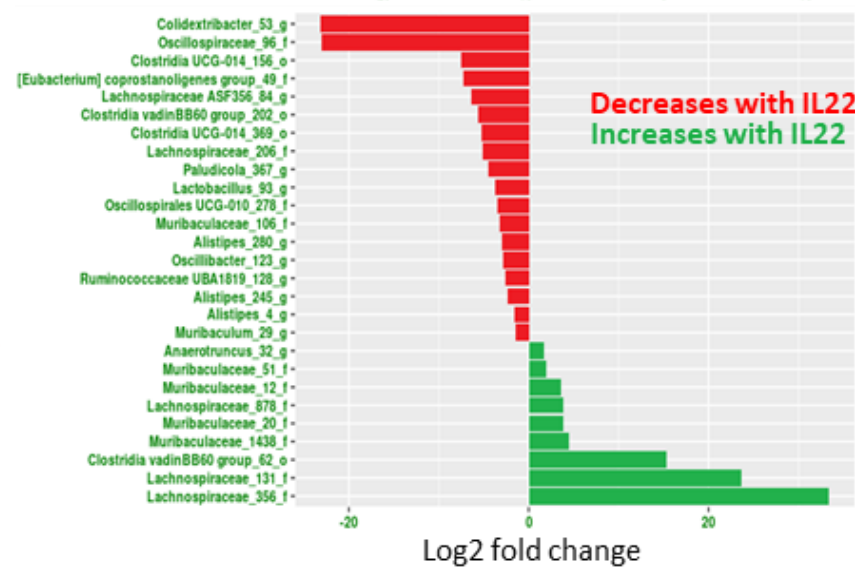
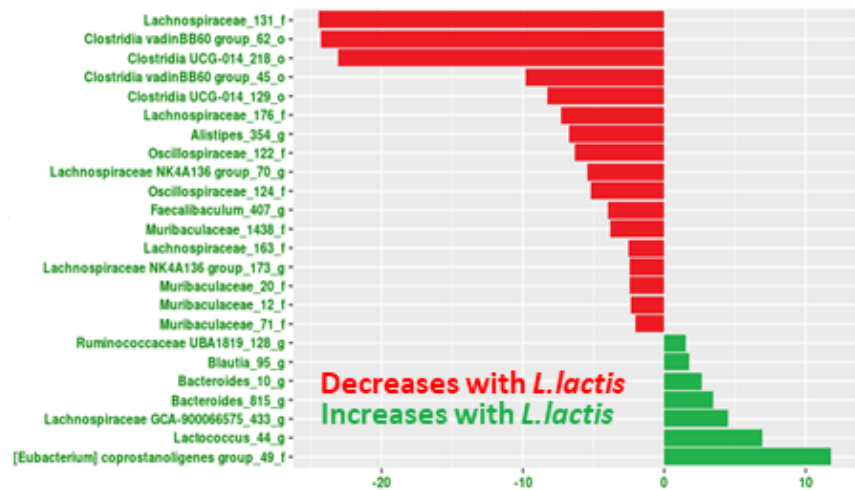
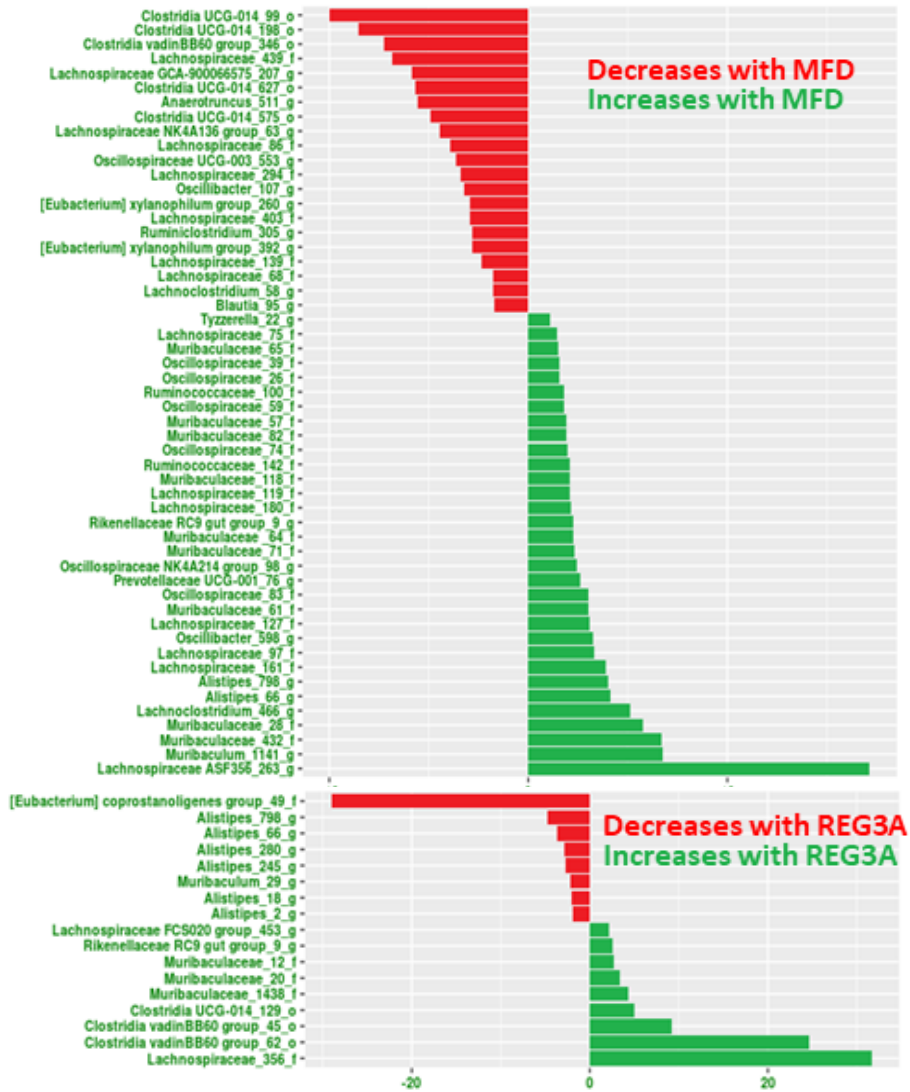


Figure 6B



Differential expression at OTU level

Figure 6C

Table 1 : PERMANOVA analysis on Bray-Curtis and weighted UniFrac distances testing the correlation of diet, treatment and transaminase levels with OTUs composition in fecal microbiota

PERMANOVA based on Bray-Curtis distance

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Diet	1	0.4636	0.46356	6.0175	0.11534	0.001 ***
Treatment	3	0.7758	0.25859	3.3567	0.19302	0.001 ***
Alat	1	0.2023	0.20225	2.6254	0.05032	0.001 ***
Asat	1	0.1124	0.11242	1.4593	0.02797	0.138
Residuals	32	2.4651	0.07703		0.61335	
Total	38	4.0191			1.00000	

PERMANOVA based on weighted UniFrac distance

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Diet	1	0.08553	0.085533	2.8503	0.06152	0.045 *
Treatment	3	0.19562	0.065205	2.1729	0.14069	0.035 *
Alat	1	0.09539	0.095388	3.1787	0.06861	0.029 *
Asat	1	0.05356	0.053556	1.7847	0.03852	0.120
Residuals	32	0.96028	0.030009		0.69066	
Total	38	1.39037			1.00000	

Table 2 : PERMANOVA analysis on Bray-Curtis and weighted UniFrac distances testing the correlation of diet, treatment and transaminase levels with genus composition in fecal microbiota

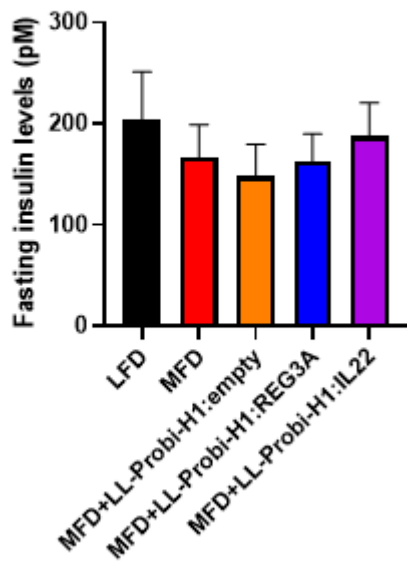
PERMANOVA based on Bray-Curtis distance

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Diet	1	0.29396	0.293959	5.8376	0.11067	0.001 ***
Treatment	3	0.53145	0.177151	3.5180	0.20008	0.001 ***
Alat	1	0.14936	0.149355	2.9660	0.05623	0.009 **
Asat	1	0.07010	0.070104	1.3922	0.02639	0.199
Residuals	32	1.61139	0.050356		0.60664	
Total	38	2.65626			1.00000	

PERMANOVA based on weighted UniFrac distance

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Diet	1	0.07892	0.078923	2.7824	0.06034	0.052 .
Treatment	3	0.17853	0.059510	2.0980	0.13649	0.046 *
Alat	1	0.09425	0.094252	3.3228	0.07205	0.038 *
Asat	1	0.04867	0.048674	1.7160	0.03721	0.134
Residuals	32	0.90767	0.028365		0.69391	
Total	38	1.30805			1.00000	

A)



B)

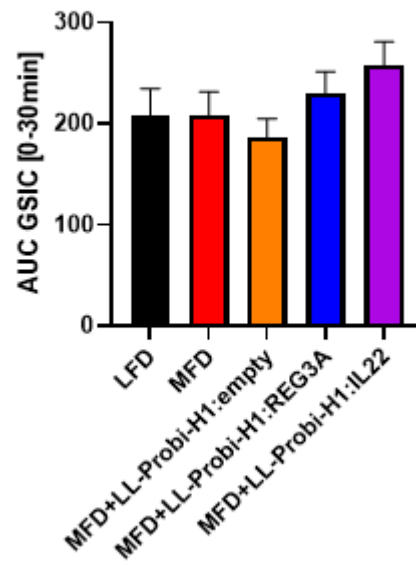


Figure S1



Supplementary table 1 : Table of relative abundances of all genera present in sample groups

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Abundances				
					LFD control	MFD control	MFD.LL-Probi-H1:empty	MFD.LL-Probi-H1:REG3A	MFD.LL-Probi-H1:IL22
Actinobacteriota	<b>Coriobacteriia</b>	<b>Coriobacteriales</b>	<b>Eggerthellaceae</b>	<b>Enterorhabdus</b>	<b>0,004%</b>	<b>0,004%</b>	<b>0,016%</b>	<b>0,023%</b>	<b>0,016%</b>
Bacteroidota	<b>Bacteroidia</b>	<b>Bacteroidales</b>	<b>Bacteroidaceae</b>	<b>Bacteroides</b>	3,399%	3,499%	9,124%	10,212%	5,422%
Bacteroidota	<b>Bacteroidia</b>	<b>Bacteroidales</b>	<b>Marinifilaceae</b>	<b>Odoribacter</b>	3,830%	5,208%	3,279%	1,098%	2,996%
<b>Bacteroidota</b>	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Muribaculum	0,988%	1,595%	2,001%	0,624%	0,570%
<b>Bacteroidota</b>	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Multi-affiliation	0,008%	0,007%	0,012%	0,005%	0,002%
<b>Bacteroidota</b>	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Others	13,719%	20,445%	12,715%	20,038%	17,542%
Bacteroidota	<b>Bacteroidia</b>	<b>Bacteroidales</b>	<b>Muribaculaceae</b>	<b>Total</b>	<b>14,716%</b>	<b>22,048%</b>	<b>14,727%</b>	<b>20,667%</b>	<b>18,114%</b>
<b>Bacteroidota</b>	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Alloprevotella	12,780%	4,358%	3,113%	3,862%	2,553%
<b>Bacteroidota</b>	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotellaceae UCG-001	0,035%	0,127%	0,161%	0,162%	0,168%
<b>Bacteroidota</b>	Bacteroidia	Bacteroidales	<b>Prevotellaceae</b>	<b>Total</b>	<b>12,815%</b>	<b>4,485%</b>	<b>3,274%</b>	<b>4,025%</b>	<b>2,721%</b>
<b>Bacteroidota</b>	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes	14,479%	18,852%	24,419%	10,910%	9,983%
<b>Bacteroidota</b>	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	0,416%	1,437%	1,548%	4,025%	9,997%
Bacteroidota	<b>Bacteroidia</b>	<b>Bacteroidales</b>	<b>Rikenellaceae</b>	<b>Total</b>	<b>14,895%</b>	<b>20,289%</b>	<b>25,967%</b>	<b>14,935%</b>	<b>19,980%</b>
Bacteroidota	<b>Bacteroidia</b>	<b>Bacteroidales</b>	<b>Tannerellaceae</b>	<b>Parabacteroides</b>	<b>4,934%</b>	<b>1,922%</b>	<b>2,279%</b>	<b>3,249%</b>	<b>2,195%</b>

<b>Bacteroidota</b>					<b>Total</b>	<b>54,588%</b>	<b>57,452%</b>	<b>58,650%</b>	<b>54,186%</b>	<b>51,428%</b>
<b>Desulfobacterota</b>	Desulfovibrionia	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Bilophila	0,055%	0,074%	0,097%	0,100%	0,068%	
<b>Desulfobacterota</b>	Desulfovibrionia	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	0,000%	0,000%	0,039%	0,000%	0,000%	
<b>Desulfobacterota</b>	Desulfovibrionia	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Others	14,235%	15,156%	13,073%	19,024%	14,659%	
<b>Desulfobacterota</b>					<b>Total</b>	<b>14,290%</b>	<b>15,229%</b>	<b>13,209%</b>	<b>19,123%</b>	<b>14,727%</b>
Firmicutes	<b>Bacilli</b>	<b>Erysipelotrichales</b>	<b>Erysipelatoclostridiaceae</b>	<b>Erysipelatoclostridium</b>	<b>0,015%</b>	<b>0,017%</b>	<b>0,009%</b>	<b>0,014%</b>	<b>0,000%</b>	
<b>Firmicutes</b>	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Dubosiella	1,112%	0,712%	0,557%	0,209%	0,462%	
<b>Firmicutes</b>	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Faecalibaculum	0,363%	0,158%	0,117%	0,212%	0,121%	
<b>Firmicutes</b>	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Turicibacter	0,074%	0,029%	0,003%	0,018%	0,068%	
Firmicutes	<b>Bacilli</b>	<b>Erysipelotrichales</b>	<b>Erysipelotrichaceae</b>	<b>Total</b>	<b>1,549%</b>	<b>0,900%</b>	<b>0,677%</b>	<b>0,439%</b>	<b>0,651%</b>	
Firmicutes	<b>Bacilli</b>	<b>Lactobacillales</b>	<b>Enterococcaceae</b>	<b>Enterococcus</b>	<b>0,099%</b>	<b>0,009%</b>	<b>0,000%</b>	<b>0,000%</b>	<b>0,004%</b>	
Firmicutes	<b>Bacilli</b>	<b>Lactobacillales</b>	<b>Lactobacillaceae</b>	<b>Lactobacillus</b>	<b>0,550%</b>	<b>0,437%</b>	<b>0,230%</b>	<b>0,114%</b>	<b>0,742%</b>	
Firmicutes	<b>Bacilli</b>	<b>Lactobacillales</b>	<b>Streptococcaceae</b>	<b>Lactococcus</b>	<b>0,002%</b>	<b>0,001%</b>	<b>0,721%</b>	<b>0,183%</b>	<b>0,910%</b>	
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Christensenellales</b>	<b>Christensenellaceae</b>		<b>0,011%</b>	<b>0,012%</b>	<b>0,014%</b>	<b>0,013%</b>	<b>0,005%</b>	
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Clostridia UCG-014</b>			<b>1,334%</b>	<b>0,409%</b>	<b>0,130%</b>	<b>0,017%</b>	<b>0,253%</b>	
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Clostridia vadinBB60 group</b>			<b>1,064%</b>	<b>0,872%</b>	<b>0,197%</b>	<b>0,006%</b>	<b>1,074%</b>	
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Clostridiales</b>	<b>Clostridiaceae</b>	<b>Clostridium sensu stricto 1</b>	<b>0,239%</b>	<b>0,532%</b>	<b>0,452%</b>	<b>0,430%</b>	<b>1,406%</b>	

<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	[Eubacterium] fissicatena group	0,000%	0,000%	0,009%	0,001%	0,027%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	[Eubacterium] xylanophilum group	0,081%	0,012%	0,017%	0,014%	0,013%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	A2	0,156%	0,097%	0,198%	0,112%	0,236%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Acetatifactor	0,005%	0,011%	0,002%	0,012%	0,007%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	ASF356	0,349%	0,105%	0,056%	0,022%	0,063%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Blautia	1,214%	0,720%	0,842%	0,385%	1,162%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	GCA-900066575	0,451%	0,284%	0,348%	0,231%	0,240%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnoclostridium	1,225%	0,995%	0,779%	1,385%	1,400%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae FCS020 group	0,074%	0,017%	0,027%	0,017%	0,047%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK4A136 group	3,500%	2,600%	1,359%	1,115%	3,209%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-006	0,103%	0,143%	0,134%	0,126%	0,172%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Marvinbryantia	0,049%	0,027%	0,047%	0,049%	0,024%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Roseburia	0,028%	0,036%	0,045%	0,091%	0,138%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Tyzzrella	0,542%	0,986%	0,860%	1,055%	0,824%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Unknown	8,300%	6,485%	7,178%	9,838%	8,787%
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Lachnospirales</b>	<b>Lachnospiraceae</b>	<b>Total</b>	<b>16,077%</b>	<b>12,517%</b>	<b>11,901%</b>	<b>14,453%</b>	<b>16,349%</b>
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Oscillospirales</b>		<b>[Clostridium] methylpentosum group</b>	<b>0,022%</b>	<b>0,014%</b>	<b>0,000%</b>	<b>0,000%</b>	<b>0,017%</b>
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Oscillospirales</b>		<b>[Eubacterium] coprostanoligenes group</b>	<b>0,415%</b>	<b>1,089%</b>	<b>3,683%</b>	<b>1,901%</b>	<b>2,384%</b>
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Oscillospirales</b>	<b>Butyricocccaceae</b>	<b>Butyricococcus</b>	<b>0,049%</b>	<b>0,096%</b>	<b>0,119%</b>	<b>0,137%</b>	<b>0,119%</b>
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Colidextribacter	1,531%	1,218%	1,122%	1,126%	1,106%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	NK4A214 group	0,035%	0,177%	0,079%	0,113%	0,108%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Oscillibacter	1,231%	0,815%	0,674%	0,580%	0,665%

<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-003	0,026%	0,001%	0,000%	0,006%	0,002%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-005	0,006%	0,007%	0,036%	0,035%	0,002%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Unkwown	2,316%	3,759%	4,179%	3,193%	3,240%
	<b>Clostridia</b>	<b>Oscillospirales</b>	<b>Oscillospiraceae</b>	<b>Total</b>	<b>5,145%</b>	<b>5,979%</b>	<b>6,090%</b>	<b>5,052%</b>	<b>5,123%</b>
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Anaerotruncus	0,551%	0,524%	0,323%	0,878%	0,607%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Harryflintia	0,029%	0,017%	0,027%	0,042%	0,023%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Multi-affiliation	0,003%	0,009%	0,007%	0,017%	0,016%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Negativibacillus	0,006%	0,012%	0,014%	0,016%	0,016%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Paludicola	0,025%	0,013%	0,007%	0,000%	0,011%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	UBA1819	0,094%	0,031%	0,068%	0,016%	0,048%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Unknown	1,576%	1,108%	0,865%	0,891%	0,891%
<b>Firmicutes</b>	<b>Clostridia</b>	<b>Oscillospirales</b>	<b>Ruminococcaceae</b>	<b>Total</b>	<b>2,285%</b>	<b>1,713%</b>	<b>1,312%</b>	<b>1,859%</b>	<b>1,612%</b>
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Oscillospirales</b>	<b>UCG-010</b>		<b>0,126%</b>	<b>0,094%</b>	<b>0,057%</b>	<b>0,060%</b>	<b>0,094%</b>
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Peptococcales</b>	<b>Peptococcaceae</b>	<b>Peptococcus</b>	<b>0,054%</b>	<b>0,014%</b>	<b>0,007%</b>	<b>0,012%</b>	<b>0,014%</b>
Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Peptococcales</b>	<b>Peptococcaceae</b>	<b>Others</b>	<b>0,034%</b>	<b>0,044%</b>	<b>0,031%</b>	<b>0,032%</b>	<b>0,015%</b>
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Anaerovoracaceae	[Eubacterium] brachy group	0,014%	0,015%	0,028%	0,041%	0,025%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Anaerovoracaceae	[Eubacterium] nodatum group	0,003%	0,013%	0,015%	0,028%	0,024%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Anaerovoracaceae	Anaerovorax	0,047%	0,015%	0,019%	0,006%	0,035%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Anaerovoracaceae	Family XIII AD3011 group	0,012%	0,002%	0,006%	0,002%	0,004%
	<b>Clostridia</b>	<b>Peptostreptococcales-Tissierellales</b>	<b>Anaerovoracaceae</b>	<b>Total</b>	<b>0,076%</b>	<b>0,044%</b>	<b>0,068%</b>	<b>0,077%</b>	<b>0,088%</b>

Firmicutes	<b>Clostridia</b>	<b>Peptostreptococcales-Tissierellales</b>	<b>Peptostreptococcaceae</b>	<b>Multi-affiliation</b>	<b>0,293%</b>	<b>0,693%</b>	<b>0,590%</b>	<b>0,415%</b>	<b>1,558%</b>
<b>Firmicutes</b>	Clostridia		Hungateiclostridiaceae	Ruminiclostridium	0,041%	0,006%	0,008%	0,005%	0,016%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Multi-affiliation	Multi-affiliation	Multi-affiliation	0,108%	0,215%	0,133%	0,158%	0,141%
<b>Firmicutes</b>	Clostridia	Others			0,031%	0,021%	0,011%	0,000%	0,008%
	<b>Clostridia</b>	<b>Others</b>		<b>Total</b>	<b>0,180%</b>	<b>0,242%</b>	<b>0,152%</b>	<b>0,162%</b>	<b>0,165%</b>
<b>Firmicutes</b>				<b>Total</b>	<b>29,618%</b>	<b>25,727%</b>	<b>26,440%</b>	<b>25,378%</b>	<b>32,583%</b>
<b>Proteobacteria</b>	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales			0,277%	0,279%	0,358%	0,261%	0,162%
<b>Proteobacteria</b>	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Sutterellaceae	Parasutterella	1,224%	1,309%	1,311%	1,029%	1,084%
<b>Total</b>					<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

Supplementary table 2 : Differential analysis of each genus whose abundance changed significantly (p<0,05) between different groups

LFD control vs MFD control											
baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
2,682974238	-3,542348947	1,0336765	-3,426941434	0,000610421	0,007055988	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-003
12,24821266	-3,310529606	0,988044	-3,350589091	0,000806399	0,007055988	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus
12,56568392	-2,91453281	0,7300424	-3,992278862	6,54414E-05	0,000916179	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	[Eubacterium] xylanophilum group
7,647344107	-2,885487579	0,9635914	-2,994513719	0,002748827	0,014801376	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	unknown order	Hungateiclostridiaceae	Ruminiclostridium
230,6028788	-2,564872167	0,6125505	-4,187201199	2,82415E-05	0,000658969	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Blautia
2,860855175	-2,298500794	0,8869498	-2,591466709	0,009556779	0,039351442	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Anaerovoraceae	Family XIII AD3011 group
17,84887163	-1,478374683	0,5688996	-2,598656789	0,009358929	0,039351442	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae FCS020 group
26,5973941	-1,23464304	0,4498124	-2,744795422	0,006054863	0,028256027	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	UBA1819
8688,878752	0,944909055	0,3674549	2,571496574	0,010126002	0,039378896	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
1650,702825	0,986231204	0,299632	3,291474844	0,000996635	0,007695238	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	unknown genus
67,33122594	0,992571434	0,3965168	2,503226811	0,012306665	0,045340344	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Multi-affiliation	Multi-affiliation	Multi-affiliation
415,6898754	1,174319226	0,2731711	4,298842065	1,71693E-05	0,000600925	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Tyzzereella
9566,78192	1,312109313	0,4246805	3,089639062	0,002003999	0,011689992	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
678,481523	1,44413021	0,4640019	3,112336586	0,001856127	0,011689992	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Muribaculum
1000,382191	1,761710022	0,539774	3,263791673	0,00109932	0,007695238	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	[Eubacterium] coprostanoligenes group	unknown genus
5,351616317	2,228183328	0,8024076	2,776872041	0,005488478	0,027442391	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Multi-affiliation
1890,025626	2,392236385	0,7067478	3,384851521	0,000712168	0,007055988	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group
56,23393149	2,477490802	0,4819639	5,140407585	2,74143E-07	1,919E-05	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	NK4A214 group
71,25483602	2,71688301	0,6658235	4,080485438	4,49417E-05	0,000786481	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotellaceae UCG-001

### MFD control vs MFD.LL-Probi-H1:empty

baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
12,24821266	-3,77783085	1,2135654	-3,113001565	0,00185195	0,039318058	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus
26,5973941	1,368751163	0,4509291	3,035402102	0,002402152	0,039318058	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	UBA1819
3383,804701	1,519808627	0,5086437	2,987963303	0,002808433	0,039318058	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
1000,382191	1,702369688	0,5387444	3,159884024	0,00157832	0,039318058	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	[Eubacterium] coprostanoligenes group	unknown genus
186,9934081	6,554364986	0,729806	8,980969139	2,68392E-19	1,87874E-17	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus

### MFD.LL-Probi-H1:empty vs MFD.LL-Probi-H1:REG3A

baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
6,141588297	-4,604806642	1,4591087	-3,155903658	0,001600017	0,02159773	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Paludicola
334,8724938	-4,160951329	1,3365874	-3,11311575	0,001851234	0,02159773	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia vadinBB60 group	unknown family	unknown genus
5,910434199	-3,716401148	1,2213619	-3,042833634	0,002343619	0,023436186	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	[Clostridium] methylpentosum group	unknown genus
215,4064554	-3,310285968	0,7929684	-4,174549829	2,98576E-05	0,001045016	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
26,5973941	-2,477425608	0,4834247	-5,124739235	2,9795E-07	2,08565E-05	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	UBA1819
678,481523	-1,60101681	0,4806256	-3,331109836	0,000865005	0,015488698	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Muribaculum
8688,878752	-1,127904627	0,3803646	-2,965324899	0,003023634	0,026456799	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
279,8076541	1,551621604	0,4666922	3,32472167	0,000885068	0,015488698	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Anaerotruncus
2,682974238	3,29527817	1,187421	2,775155609	0,00551753	0,042914123	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-003

### MFD.LL-Probi-H1:empty vs MFD.LL-Probi-H1:IL22

baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
678,481523	-1,940753051	0,4650564	-4,17315662	3,00408E-05	0,002102858	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Muribaculum
8688,878752	-1,377522653	0,3675153	-3,748205086	0,000178105	0,004155774	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
1890,025626	2,702632207	0,7060301	3,827928004	0,000129227	0,004155774	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group

Supplementary table 3 : Differential analysis of each OTU whose abundance changed significantly ( $p < 0,05$ ) between different groups

LFD control vs MFD control

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
Cluster_99	41,24046107	-10,00210364	3,724490317	-2,685495945	0,007242225	0,047492286	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
Cluster_198	15,056047	-8,546945779	1,563169976	-5,467700832	4,55911E-08	7,77327E-06	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
Cluster_346	6,122884133	-7,248560244	1,648440532	-4,39722277	1,09645E-05	0,000339899	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia vadinBB60 group	unknown family	unknown genus
Cluster_439	4,815054731	-6,814080521	1,498801645	-4,546352444	5,45836E-06	0,000255869	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
Cluster_207	8,197673843	-5,871977497	1,565210067	-3,751558735	0,000175739	0,002397074	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	GCA-900066575
Cluster_627	2,072417894	-5,689243397	1,974928074	-2,880734479	0,003967497	0,032212299	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
Cluster_511	3,451161311	-5,573581809	1,921170229	-2,901138964	0,00371809	0,031696713	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Anaerotruncus
Cluster_575	2,804372203	-4,936101715	1,745911768	-2,827234346	0,004695195	0,035579147	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
Cluster_63	64,190114	-4,454324126	1,401587028	-3,178057471	0,001482654	0,01633927	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK4A136 group
Cluster_86	43,76668755	-3,937806437	0,879194007	-4,478882254	7,50349E-06	0,000255869	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
Cluster_553	2,650336965	-3,626672887	1,159643886	-3,12740224	0,001763585	0,017182353	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-003
Cluster_294	6,887859466	-3,378555775	0,827564906	-4,082526638	4,45487E-05	0,000949444	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
Cluster_107	35,97531163	-3,242450329	0,646581723	-5,01475717	5,31005E-07	4,52682E-05	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Oscilibacter
Cluster_260	8,095769426	-2,954287395	0,772497857	-3,824330862	0,000131128	0,001961261	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	[Eubacterium] xylanophilum group
Cluster_403	4,805124599	-2,921929879	0,764469601	-3,822166214	0,000132284	0,001961261	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
Cluster_305	7,737280771	-2,825742438	1,017278406	-2,777747392	0,005473715	0,038296743	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	unknown order	Hungateiclostridiaceae	Ruminiclostridium
Cluster_392	4,266610909	-2,795057773	1,021142748	-2,737186136	0,006196722	0,041432984	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	[Eubacterium] xylanophilum group
Cluster_139	22,79499534	-2,364198192	0,676290966	-3,495829917	0,00047259	0,005755469	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
Cluster_68	67,4947484	-1,782910483	0,587113056	-3,036741331	0,002391506	0,022040635	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus



<b>Cluster_58</b>	118,8032382	-1,740192104	0,550807162	-3,159349083	0,001581222	0,01633927	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnoclostridium
<b>Cluster_95</b>	46,41254823	-1,70133167	0,608152126	-2,797542912	0,005149293	0,037359762	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Blautia
<b>Cluster_22</b>	414,1935432	1,07718062	0,266332227	4,044499737	5,2435E-05	0,00104946	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Tyzzereella
<b>Cluster_75</b>	94,5628618	1,431477593	0,502348401	2,849571311	0,004377819	0,033928098	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_65</b>	95,80419229	1,51650163	0,440439775	3,44315322	0,000574973	0,006760895	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_39</b>	235,4110624	1,572005693	0,442141407	3,555436493	0,000377352	0,004765817	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_26</b>	308,4300638	1,57324541	0,574184885	2,739963121	0,006144608	0,041432984	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_100</b>	60,24436987	1,777507554	0,667363702	2,663476526	0,007733781	0,049758854	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	unknown genus
<b>Cluster_59</b>	114,5843593	1,819207762	0,487992243	3,727944017	0,000193048	0,002531902	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_57</b>	110,2804622	1,89847986	0,422932506	4,488848295	7,16093E-06	0,000255869	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_82</b>	123,2662833	1,927352775	0,480699377	4,009476334	6,08536E-05	0,001092161	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_74</b>	71,34127575	1,987197657	0,694534347	2,861194218	0,004220484	0,033469421	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_142</b>	27,1115985	2,065136673	0,65322508	3,161447311	0,001569872	0,01633927	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	unknown genus
<b>Cluster_118</b>	41,60053361	2,081711678	0,461076478	4,514894546	6,33483E-06	0,000255869	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_119</b>	31,79963741	2,102907027	0,700596332	3,001595828	0,002685685	0,024100489	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_180</b>	16,0049815	2,115320549	0,673166091	3,142345668	0,001676	0,016809298	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_9</b>	1867,191025	2,237463257	0,706864482	3,165335529	0,001549042	0,01633927	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group
<b>Cluster_64</b>	94,42169601	2,254404701	0,474889033	4,747224179	2,06227E-06	0,000117206	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_71</b>	123,1718298	2,310647512	0,558458679	4,137544278	3,51043E-05	0,000798037	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_98</b>	56,33824328	2,422938374	0,497732287	4,867954995	1,12759E-06	7,69016E-05	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	NK4A214 group
<b>Cluster_76</b>	74,24093018	2,622410607	0,696660654	3,764258239	0,000167044	0,00237342	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotellaceae UCG-001
<b>Cluster_83</b>	58,03791573	3,015128107	0,7478725	4,031607133	5,53967E-05	0,00104946	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_61</b>	90,13550064	3,028205678	0,779170342	3,886448847	0,000101721	0,001651761	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_127</b>	37,38828122	3,064553827	0,769885439	3,98053226	6,87611E-05	0,001172377	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_598</b>	3,905637778	3,271579732	1,164988819	2,808249899	0,004981156	0,036925524	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Oscillibacter
<b>Cluster_97</b>	60,3390449	3,320090422	1,195993667	2,776010035	0,005503051	0,038296743	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_161</b>	40,28214722	3,878900362	1,318559524	2,941771145	0,00326341	0,028533919	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus

<b>Cluster_798</b>	3,592058764	3,985840175	1,382693567	2,882663426	0,003943285	0,032212299	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_66</b>	83,65010785	4,127667447	0,957189091	4,312280078	1,6158E-05	0,000423836	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_466</b>	4,902054925	5,128487359	1,644706558	3,118177727	0,00181973	0,01723689	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnoclostridium
<b>Cluster_28</b>	854,1252649	5,766573546	1,12342121	5,133046711	2,85089E-07	3,24051E-05	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_432</b>	7,214799416	6,682178113	1,53563556	4,351408817	1,35266E-05	0,00038438	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_114 1</b>	3,743223703	6,750303651	1,586579746	4,254626134	2,09399E-05	0,000510035	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Muribaculum
<b>Cluster_263</b>	8,974244107	17,16105971	2,128383139	8,062956052	7,44713E-16	2,53947E-13	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	ASF356

### MFD control vs MFD.LL-Probi-H1:empty

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
<b>Cluster_131</b>	38,24770031	-24,45833083	4,508151275	-5,425357167	5,78388E-08	4,64156E-06	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_62</b>	74,00947619	-24,3060553	1,851617838	-13,12692868	2,3083E-39	7,40965E-37	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia vadinBB60 group	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_218</b>	7,0345716	-23,06754665	4,34873012	-5,304432792	1,13024E-07	7,25613E-06	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_45</b>	180,5029483	-9,783042342	2,064206406	-4,739372145	2,14381E-06	7,72021E-05	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia vadinBB60 group	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_129</b>	27,01298937	-8,281324334	1,440465217	-5,749062343	8,97397E-09	9,60215E-07	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_176</b>	21,7794868	-7,341182231	1,549615551	-4,737421629	2,16455E-06	7,72021E-05	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_354</b>	6,470139738	-6,762261303	1,915735262	-3,529851664	0,000415793	0,007851145	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_122</b>	25,56126094	-6,293477564	1,553963863	-4,04995104	5,12283E-05	0,001370358	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_70</b>	3,100511602	-5,478530008	1,776803627	-3,083362689	0,002046755	0,032850424	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK4A136 group
<b>Cluster_124</b>	29,92857268	-5,161738443	1,242671894	-4,153742003	3,27082E-05	0,000954485	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_407</b>	9,073401759	-3,995525478	1,328847869	-3,006759142	0,002640489	0,040361758	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Faecalibaculum
<b>Cluster_143 8</b>	4,728678007	-3,860034691	1,053192721	-3,665079159	0,000247262	0,005291409	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_163</b>	18,53946217	-2,511723397	0,742583904	-3,382410235	0,000718528	0,012813741	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_173</b>	16,11550022	-2,471713335	0,851588535	-2,902473709	0,003702282	0,049518026	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK4A136 group
<b>Cluster_20</b>	543,6767819	-2,462793547	0,501056456	-4,91520171	8,86911E-07	4,06712E-05	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_12</b>	1945,26333	-2,340278943	0,522007081	-4,483232179	7,35209E-06	0,000236002	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus

<b>Cluster_71</b>	123,1718298	-2,069058336	0,558917348	-3,701903945	0,000213988	0,004906431	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_128</b>	27,3231366	1,520952859	0,493126004	3,084308769	0,002040257	0,032850424	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	UBA1819
<b>Cluster_95</b>	46,41254823	1,776966594	0,609235961	2,916713238	0,003537408	0,049369916	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Blautia
<b>Cluster_10</b>	2173,2257	2,613155617	0,717522847	3,641912766	0,00027062	0,005429309	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
<b>Cluster_815</b>	5,5453475	3,468249157	1,161765335	2,985326772	0,002832755	0,041332476	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
<b>Cluster_433</b>	4,209122465	4,484990106	1,188847507	3,772552898	0,000161586	0,003989924	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	GCA-900066575
<b>Cluster_44</b>	188,9546777	6,907913525	0,733995301	9,411386574	4,89634E-21	7,85863E-19	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus
<b>Cluster_49</b>	318,8349922	11,81521554	2,362983269	5,000126619	5,72927E-07	3,06516E-05	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	[Eubacterium] coprostanoligenes group	unknown genus

### MFD.LL-Probi-H1:empty vs MFD.LL-Probi-H1:REG3A

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
<b>Cluster_53</b>	90,96373185	-23,16208837	2,027567356	-11,42358517	3,18805E-30	5,00525E-28	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Colidextribacter
<b>Cluster_96</b>	35,98236684	-22,98757456	1,80217263	-12,75547868	2,90584E-37	9,12435E-35	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_156</b>	17,86592423	-7,4980282	1,87078777	-4,007952329	6,12475E-05	0,001602642	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_49</b>	318,8349922	-7,286964569	2,343128812	-3,109929139	0,001871322	0,032644178	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	[Eubacterium] coprostanoligenes group	unknown genus
<b>Cluster_84</b>	46,79616628	-6,397354926	1,571485493	-4,070896585	4,68325E-05	0,001336856	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	ASF356
<b>Cluster_202</b>	12,18693711	-5,570578582	1,888007937	-2,950505912	0,00317254	0,039847099	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia vadinBB60 group	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_369</b>	5,544989891	-5,218478207	1,540695818	-3,387091822	0,000706377	0,013862657	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_206</b>	14,10690116	-5,137799023	1,758778504	-2,921231419	0,003486507	0,042106282	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_367</b>	5,868043377	-4,461288937	1,501095521	-2,972022016	0,002958455	0,039847099	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Paludicola
<b>Cluster_93</b>	41,17491275	-3,717155509	1,258054647	-2,954685249	0,003129882	0,039847099	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus
<b>Cluster_278</b>	8,651637445	-3,507078055	1,226537138	-2,859332953	0,004245329	0,049371609	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	UCG-010	unknown genus
<b>Cluster_106</b>	38,9657673	-3,18659719	0,927315819	-3,436366689	0,000589572	0,012341716	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_280</b>	9,388442356	-2,922309059	0,666372456	-4,385398933	1,15773E-05	0,000403921	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_123</b>	28,02107672	-2,841370054	0,821940514	-3,456904735	0,000546418	0,012255375	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Oscillibacter

<b>Cluster_128</b>	27,3231366	-2,557226201	0,529435036	-4,830103841	1,36462E-06	5,35613E-05	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	UBA1819
<b>Cluster_245</b>	11,00141391	-2,35155355	0,633404094	-3,712564496	0,00020517	0,004955639	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_4</b>	2675,243161	-1,547586199	0,508760001	-3,041878678	0,002351066	0,036911741	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_29</b>	656,8565564	-1,45547569	0,487478438	-2,985723216	0,002829086	0,039847099	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Muribaculum
<b>Cluster_32</b>	264,9700057	1,704121716	0,527388491	3,231245551	0,00123252	0,022765371	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Anaerotruncus
<b>Cluster_51</b>	143,2898108	1,969196796	0,640170684	3,076049631	0,002097629	0,034666084	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_12</b>	1945,26333	3,609470436	0,540171741	6,682079354	2,35575E-11	1,23284E-09	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_878</b>	3,602905915	3,814494895	1,275327083	2,990993405	0,002780715	0,039847099	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Multi-affiliation
<b>Cluster_20</b>	543,6767819	3,839183166	0,51795576	7,412183556	1,24237E-13	9,75258E-12	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_143</b>	4,728678007	4,522110344	1,061576951	4,259804567	2,04606E-05	0,000642462	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_62</b>	74,00947619	15,30269802	2,056061522	7,442723796	9,86302E-14	9,75258E-12	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia vadinBB60 group	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_131</b>	38,24770031	23,66097842	4,662630237	5,074598933	3,88314E-07	1,74187E-05	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus
<b>Cluster_356</b>	5,860817319	33,40383014	4,719725027	7,077494971	1,46784E-12	9,218E-11	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus

#### MFD.LL-Probi-H1:empty vs MFD.LL-Probi-H1:IL22

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
<b>Cluster_49</b>	318,8349922	-29,00400435	2,369568767	-12,24020369	1,89556E-34	3,23194E-32	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	[Eubacterium] coprostanoligenes group	unknown genus
<b>Cluster_798</b>	3,592058764	-4,76868039	1,354750715	-3,519968904	0,000431597	0,009811647	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_66</b>	83,65010785	-3,716103661	0,953913663	-3,895639414	9,794E-05	0,002569042	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_280</b>	9,388442356	-2,913300853	0,649638125	-4,484497971	7,30858E-06	0,000356032	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_245</b>	11,00141391	-2,719550404	0,63273466	-4,298089827	1,72276E-05	0,000652736	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_29</b>	656,8565564	-2,115622291	0,471669093	-4,485395215	7,27789E-06	0,000356032	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	Muribaculum
<b>Cluster_18</b>	654,0639163	-2,015510736	0,471727769	-4,272614143	1,93195E-05	0,000658794	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_2</b>	4536,953192	-1,946829715	0,464436123	-4,191813729	2,76733E-05	0,000857873	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes
<b>Cluster_453</b>	10,03898583	2,187628328	0,688469666	3,177523187	0,001485388	0,029795138	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae FCS020 group
<b>Cluster_9</b>	1867,191025	2,551240485	0,706138632	3,612945628	0,000302738	0,007373838	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group

<b>Cluster_12</b>	1945,26333	2,706232811	0,521997877	5,184375127	2,1674E-07	1,47817E-05	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_20</b>	543,6767819	3,307082653	0,500839964	6,603072619	4,02722E-11	3,43321E-09	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_1438</b>	4,728678007	4,340418987	1,048218717	4,140756997	3,46162E-05	0,000983676	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus
<b>Cluster_129</b>	27,01298937	5,017753925	1,458354252	3,440696194	0,00058022	0,012365931	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia UCG-014	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_45</b>	180,5029483	9,182186908	2,064366778	4,447943556	8,66963E-06	0,000369543	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia vadinBB60 group	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_62</b>	74,00947619	24,68886589	1,851558064	13,33410298	1,46608E-40	4,99932E-38	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia vadinBB60 group	unknown family	unknown genus
<b>Cluster_356</b>	5,860817319	31,71883604	4,567387093	6,944634951	3,7944E-12	4,31297E-10	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	unknown genus

## **Discussion et conclusion générale**



## Les effets immunomodulateurs de la cathélicidine humaine

Les peptides antimicrobiens suscitent l'intérêt depuis de nombreuses années en raison de leur action antibiotique à large spectre. Chez l'individu sain ils sont produits notamment au niveau des barrières épithéliales où ils protègent l'hôte contre les infections par les bactéries pathogènes transitoires et permettent le maintien de la tolérance immunitaire des bactéries commensales qui leur sont résistantes[438]. L'équilibre entre les PAMs et le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans le maintien de la santé de l'individu. Toute rupture de cet équilibre entraîne une dysbiose et une réaction inflammatoire qui, si elles ne se résorbent pas, participent activement à la pathogénèse de troubles chroniques. C'est le cas notamment pour les MICI qui se caractérisent par une inflammation chronique et une réponse immunitaire dirigée contre les bactéries commensales liée à la perte des lymphocytes Treg, leur production des cytokines immunorégulatrices IL10 et TGF- $\beta$ , en faveur des lymphocytes T effecteurs[79]. Les PAMs assurent en temps normal la séparation de la barrière intestinale et des bactéries intestinales[291]. Une déficience génétique des cellules de Paneth, qui les produisent, rend susceptible aux formes graves de MICI[297]. Chez les patients atteints de MC, le taux circulant de LL37 est corrélé à un meilleur pronostic et permet d'identifier l'état d'activité de la maladie[331].

Chez les souris Camp-/- la colite induite au DSS est aggravée et les symptômes sont atténués par la transplantation de cellules immunitaires provenant de souris sauvages exprimant la cathélicidine[439]. Un certain nombre d'études constate que l'administration de la cathélicidine murine via *L.lactis* recombinant entraîne l'amélioration des symptômes cliniques et de l'état des tissus dans des modèles d'induction chimique de la colite qui accompagnent une réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et une expression accrue d'IL10 et des protéines des jonctions serrées[389,417,418]. Cet effet passerait par la régulation du microbiote intestinal mais également par des effets directs de la cathélicidine sur les voies de régulation de la réponse immunitaire[389]. Durant ma thèse, des résultats similaires ont pu être obtenus avec la cathélicidine humaine dans une approche où *L.lactis* porte un plasmide possédant le promoteur CMV permettant l'expression de celle-ci par les cellules de l'individu traité[373,374]. Un effet intéressant observé est **l'augmentation de l'expression d'IL17A**. Des expériences sur souris IL17A-KO mettent en évidence une baisse de la gravité des symptômes de la colite induite chez ces souris, la mettant directement en cause dans la pathogénèse de la maladie[440]. Cependant toutes les tentatives de traitement des MICI par des inhibiteurs d'IL17 se sont soldées par des échec et même une exacerbation des symptômes chez les patients[345,425,426]. Ainsi, chez le patient classique, IL17A aurait en réalité un rôle protecteur. Une étude récente suggère que le manque d'IL17A, dans le cadre d'une inflammation chronique, exacerberait l'inflammation en induisant



l'expression d'IL6 et le recrutement des cellules lymphoïdes innées[428]. Deux études séparées ont montré que la délétion d'IL17A[429] et d'IL6[441] respectivement exacerbent l'inflammation chez les souris déficientes en IL10. Tout comme pour IL17A, la délétion d'IL6 seule réduit les symptômes de la colite induite[442]. Il pourrait être intéressant de vérifier si la neutralisation simultanée d'IL17A et d'IL6 permet l'amélioration des symptômes de la colite chez la souris sauvage et de vérifier le recrutement des cellules du système immunitaire de ces animaux.

### **Dose-réponse de la cathélicidine dans le modèle de colite induite et l'effet probiotique de *L. lactis***

*L.lactis* **sécrétant hCAP18** n'a pas permis d'améliorer les symptômes de la colite de façon reproductive par rapport à la bactérie elle-même en modèle DNBS comme en modèle DSS (à voir en annexe). De plus aucune différence significative n'a été observée entre le microbiote de nos souris recevant la cathélicidine humaine et celle des souris ayant reçu la souche *L. lactis* contrôle que ça soit par la souche sécrétant hCAP18 ou celle induisant l'expression chez les cellules de l'hôte. L'absence d'effet de nos souches recombinantes chez le rongeur pourrait être liée à l'origine humaine de la protéine ou à un mauvais repliement potentiel. Cela étant dit, l'effet probiotique de ***L.lactis* a amélioré de façon significative la colite induite par le DNBS chez nos souris**, ce qui n'était pas le cas dans les études précédemment citées. Il est donc possible que l'effet de LL37 ait été masqué par celui de la bactérie. De plus, les doses administrées diffèrent entre nos études. Clover Ching Man Wong et al. ont préparé des doses fraîches quotidiennes (variant entre  $10^8$  et  $10^{10}$  CFU) et Jiahong Li et al. ont quand à eux administré  $10^{10}$  CFU de culot bactérien congelé (contre  $10^9$  CFU dans notre cas). Dans les deux cas, le temps d'induction à la nisine a été plus long que pour nos préparations ce qui a sans doute joué sur la dose de cathélicidine finale reçue par nos animaux qui a dû être plus faible que dans ces autres publications. Une **étude dose-réponse** serait pertinente pour déterminer les conditions idéales d'utilisation de ces souches.

En outre, il semble que la nature du plasmide utilisé comme vecteur, même vide d'insert, a un impact sur la croissance viable de nos bactéries et sur l'atténuation des symptômes de la colite. Ainsi, alors que les *L. lactis* porteurs du plasmide pSEC:vide inductible à la nisine ont un effet anti-inflammatoire significatif sur plusieurs marqueurs la colite induite au DNBS, ce n'est pas le cas des *L. lactis* porteurs du plasmide ProBiH1:vide (voir chapitre 1). Nous pensons que la viabilité réduite des *L. lactis* porteurs de ProBiH1 (voir material and methods, chapitre 1) explique en grande partie cette différence d'effet. A noter que l'effet protecteur de *L. lactis* n'est pas significatif dans toutes les études. Ainsi en 2017, notre équipe a constaté un effet protecteur des sécrétions de *L. lactis* NZ9000 (utilisée pendant cette thèse) qui inhibait la croissance des bactéries pathogènes *L. monocytogenes* et *E. faecalis*, réduisait le score

histopathologique, l'activité MPO et l'infiltration des eosinophiles dans la *lamina propria* intestinale des souris dans un modèle de mucosite induite au 5-fluorouracile[443]. Deux ans plus tard, la même souche ne montrait aucun effet protecteur sur la colite induite au DNBS[444]. Prises indépendamment, les différences d'effets entre ces deux études pouvaient être attribuées aux différents modèles chimiques ou même aux variétés de souris - l'étude de 2017 utilisait des BALB/c tandis que celle de 2019 utilisait des C57BL/6. Une étude plus antérieure comparant *in vitro* plusieurs souches de *L. lactis* a montré que *L. lactis* MG1363, la parente de NZ9000, ne réduisait pas significativement l'expression d'IL8 induite par IL1 $\beta$  sur des cellules Caco-2[358]. Ma thèse ayant utilisé *L. lactis* NZ9000 suivant un protocole proche de l'étude de 2019, l'observation d'un effet anti-inflammatoire est apparue comme surprenante.

Plusieurs hypothèses quant aux raisons de celle-ci ont été envisagées ; notamment celle d'une différence de **microbiote intestinal de départ** en fonction des lots de souris. Il devient en effet reconnu que la composition du microbiote intestinal des patients joue un effet important sur l'effet pharmacologique des traitements reçus. Par exemple, le traitement par antibiotiques réduit fortement l'efficacité des traitements anticancéreux reposant sur l'induction de la production de TNF, laquelle est positivement corrélée à la présence de certains genres bactériens comme *Alistipes* et *Ruminococcus*. L'administration d'*Alistipes shahii* à des animaux traités par antibiotiques permet de rendre aux cellules myéloïdes leur capacité à produire de la TNF[445]. On peut également **prédire une mauvaise réponse aux traitements** anti-PD1 (programmed cell death protein 1) chez les patients avec un faible niveau d'*Akkermansia muciniphila*[446]. Par ailleurs, la transplantation de microbiote fécal en provenance de patients ayant répondu favorablement au traitement par anti-PD1 permet d'améliorer les effets de ce traitement chez la souris[447]. Nous savons également que les bactéries du microbiote intestinal agissent en **synergie** les unes avec les autres. Par exemple *Bifidobacterium* améliore la production de butyrate par *F. prausnitzii*[144]. Il est donc possible que la souche NZ9000 devienne anti-inflammatoire lorsqu'elle entre en interaction avec certaines bactéries du microbiote intestinal. Malheureusement, il serait aujourd'hui difficile de comparer les microbiotes de départ de nos précédentes études. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions tester la bactérie dans un modèle axénique et comparer son effet anti-inflammatoire dans un modèle de colite induite chimiquement en l'administrant après transplantation de microbiote fécal en provenance de souris répondeuses et non répondeuses à *L. lactis* dans un cas, et en administrant *L. lactis* seule dans un autre cas.

### **L'impact de la cathélicidine humaine sur la composition du microbiote intestinal**

Nous avons bien observé un effet significatif de la cathélicidine sur la colite induite avec **l'approche vaccin à ADN**. Les souris ainsi traitées ont eu une reprise de poids plus rapide ainsi qu'une amélioration

visible de l'état du colon par rapport aux souris contrôle. L'apport de ***L. lactis*** a très peu impacté la **composition du microbiote**. Un OTU du genre *Lachnospiraceae* a diminué dans le groupe traité tandis qu'une *Muribaculaceae*, un *Ruminococcaceae* et une *Clostridia* ont augmenté. Nous n'avons pu observer aucune différence significative dans la composition du microbiote fécal entre le groupe ayant reçu la souche *L.lactis* vide et celle où *L.lactis* contenait le plasmide induisant l'expression de hCAP18. Nous avons tenté une expérience de transfert de flore afin de vérifier si les modifications apportées par *L.lactis* pouvaient avoir un effet positif sur les symptômes de la colite ainsi que pour nous assurer de l'équivalence entre le microbiote modifié par la bactérie lactique vide et la bactérie lactique induisant l'expression de hCAP18. Aucune différence notable n'a été observée entre nos groupes ce qui a priori semble exclure un effet du microbiote dans l'amélioration des symptômes que nous avons observée précédemment. Ce serait donc les effets immunomodulateurs directs de hCAP18 qui permettraient l'amélioration de la colite. Il reste cependant possible que l'âge plus avancé des animaux ayant subi le transfert (en raison du temps d'attente laissé pour la stabilisation du microbiote post-transplantation) ait joué sur les symptômes observés. On observe en effet que les symptômes de la colite de ces animaux sont réduits par rapport aux précédents groupes expérimentaux, ce qui ne facilite pas la discrimination entre les groupes traités et non traités.

Une autre étude récente a montré que les souris NOD (diabétiques non-obèses) traitées avec mCRAMP avaient une augmentation de *Lactobacillus johnsonii*, *Candidatus arthromitus SFB* et *Muribaculaceae sp* et une diminution en *Akkermansia muciphila*, *Bacteroides caecimuris* et *Clostridium sp*[334]. D'une façon générale, la cathélicidine a un effet antimicrobien contre les pathogènes entériques tels que *Citrobacter rodentium* et les *E. coli* adhérentes invasives[449]. Cependant les études de composition du microbiote de souris avec ou sans cathélicidine donnent des résultats variables[306,449,450]. En concordance avec nos résultats, John Gubatan et al. ont observé qu'une administration intra-rectale de cathélicidine n'a aucun impact sur la composition du microbiote des souris (7 jours d'administration intrarectale puis induction de la colite au DSS, prélèvement feces 0, 7 et 15j après le début de l'induction au DSS) malgré une amélioration des symptômes induits par le DSS. Ils démontrent également que la cathélicidine empêche la croissance d'*E. coli*. Dans leur publication, ils évoquent qu'un problème de dosage (qu'ils ont fixé à 5mg/kg) ou une mauvaise répartition de la cathélicidine (la délivrance par voie intrarectale n'atteindrait que la partie gauche du colon) pourrait expliquer leurs résultats[451]. Cependant, en la mettant en parallèle avec notre étude, nous pourrions plutôt penser que la cathélicidine est très bien tolérée par la plupart des bactéries commensales. En outre Brain J. McHugh et al. démontrent en 2019 que **l'infection** pulmonaire par *P. aeruginosa* **induit la production de cathélicidine indépendamment du système de sécrétion**. Ils en concluent que la cathélicidine joue

principalement un rôle de signal pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les cellules épithéliales. Nous pensons donc que la cathélicidine améliore les symptômes de la colite par 2 mécanismes : 1) la prévention de l'infection par des bactéries pathogènes étrangères et 2) la régulation directe du système immunitaire.

### **L'effet de REG3A sur le syndrome métabolique**

Le microbiote intestinal a également été mis en cause dans le développement du syndrome métabolique. Cela part du constat que l'alimentation joue un rôle clé dans la composition du microbiote intestinal et que l'obésité s'accompagne d'une inflammation chronique de bas grade systémique résultant du développement des troubles associés à l'obésité tels que la résistance à l'insuline, la maladie du foie-gras ou des atteintes cardiovasculaires. En ce qui concerne les PAMs, on observe que l'expression des lectines de type C de la famille Reg3 est réduite et le microbiote modifié avant l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires chez les animaux en régime surgras[335]. Durant ma thèse j'ai pu montrer que l'administration quotidienne de **LL-probiH1:REG3A** à des souris **réduit la prise de poids ainsi que les lésions hépatiques** dues au régime surgras (chapitre 2).

La concentration d'insuline mesurée chez nos animaux en régime contrôle juste avant le test de tolérance au glucose (16h de jeûn) nous semble anormalement élevée ( $>150\mu\text{U/mL}$ ) et il est possible que les animaux aient gardé l'accès à des réserves de nourriture cachées dans leur litière ou que les échantillons aient été contaminés par du sang d'animaux des autres groupes. Par ailleurs les groupes contrôles en régime conventionnel et en régime surgras n'ont pas de différence dans leur profil glycémique et restent basses pour tous les groupes. De fait, aucun de nos animaux ne pouvait véritablement être considéré comme diabétique ( $>240\text{mg/dL}$  pour la glycémie et  $>150\mu\text{U/mL}$  pour l'insulinémie à jeûn)[452]. Cela n'empêche pas malgré tout de constater des différences entre nos groupes. Ainsi, on n'observe pas d'effet visible de LL-probiH1:REG3A sur la tolérance au glucose mais en revanche **elle augmente la tolérance à l'insuline des animaux**, ce qui semble paradoxal vu ses effets sur la prise de poids et la stéatose hépatique. En 2018, l'étude de Bluemel et al. a démontré que les animaux déficients en Reg3b étaient protégés contre l'intolérance au glucose provoquée par un régime occidental, mais pas contre la stéatose hépatique[453]. Cet effet paradoxal des lectines de la famille Reg3 reste donc à élucider.

### **L'effet probiotique de *L.lactis* sur le modèle d'obésité**

Nous notons que l'administration de *L. lactis* en elle-même a des effets bénéfiques importants sur nos deux modèles. Elle permet d'atténuer en grande partie les symptômes de la colite et diminue la prise de poids et l'accumulation de lipides dans le foie des animaux, même si cela ne se reflète pas de façon

significative sur les marqueurs d'inflammation du foie dans le sang ou sur l'accumulation de lipides dans le foie. D'autres études avaient déjà observé un effet anti-inflammatoire de certaines souches de *L. lactis* dans des modèles d'induction chimique[358] et génétiques[454] ainsi qu'un effet bénéfique sur la prise de poids et la progression de la NAFLD induite par régime surgras en prise orale[455,456] et également intranasale[416].

De fait, les études de populations semblent montrer un effet modeste de la consommation de yaourt sur la prise de poids et la santé des individus[457]. Une étude expérimentale sur rats démontre que l'apport de caséine (une protéine fortement présente dans les produits laitiers) pendant 7 jours augmente l'abondance de *L. lactis* et *Bifidobacterium pseudolongum* dans le caecum et régule le métabolisme du galactose ainsi que l'expression de gènes associés à la prévention de l'obésité comme Adipoq, qui module le métabolisme du glucose et l'oxydation des acides gras, et Irs1, qui encode l'insuline receptor substrate-1 dans la voie de signalisation de l'insuline[458].

### **Le rôle des genres *Allistipes* et *Muribaculum* dans le développement de pathologies intestinales**

L'administration de *L. lactis* induisant l'expression de REG3A à des souris nous a permis de confirmer l'effet protecteur de celle-ci contre la NAFLD et d'observer des effets considérables sur la composition de leur microbiote intestinal. Une PERMANOVA révèle que sa composition du microbiote corrèle avec l'alimentation, le traitement suivi et le taux d'alanine aminotransférase dans le sang (tables 1 et 2, chapitre 2). Le groupe ayant reçu LL-probiH1:REG3A se caractérise notamment par la **réduction des bactéries des genres *Alistipes* et *Muribaculum***. A ce jour, les propriétés de *Muribaculum* [459] et *Alistipes*[460] sont encore assez mal connues bien qu'il s'agisse de genres bactériens particulièrement abondants chez la souris[461]. Dans le genre *Alistipes*, l'espèce *A. finegoldii* a montré des résultats protecteurs dans le développement de la colite mais pathogénique dans le développement du cancer colorectal. Par ailleurs *Alistipes* est généralement considérée comme un genre protecteur en raison de sa production d'AGCC et sa diminution dans le microbiote d'individus obèses, ce qui est en contradiction directe avec nos résultats[460]. Pourtant d'autres études sur souris montrent que la déficience en IL22 et en Reg3 est liée à une surabondance d'*Alistipes* et rend le microbiote colitogène[116,462]. Une quantification des métabolites lipidiques des compartiments fécal et caecal de nos souris pourra être effectuée afin de vérifier si des corrélations peuvent être établies entre les modifications apportées à leur microbiote, la concentration en AGCC et la gravité des symptômes hépatiques.

**Le genre *Alistipes* étant constitué de nombreuses espèces** (au moins 12 publiées), il est tout à fait possible que celles-ci aient des effets très différentes les unes des autres. Le séquençage 16S est

malheureusement limitatif dans l'identification des espèces. Aucune d'entre elles n'a, à ma connaissance, été testée expérimentalement sur un modèle d'obésité et seule *A. finegoldii* a été testée sur un modèle d'inflammation de l'intestin. Nombre d'entre elles sont cultivables, ce qui rend ce type d'expérience accessible[460].

### **Le rôle paradoxal d'IL22 dans le développement de la NAFLD**

Il apparaît qu'IL22, bien qu'induisant les **mêmes effets sur le microbiote intestinal que REG3A**, a des **effets totalement inverses sur le développement de la NAFLD** et l'exacerbe par rapport à nos groupes contrôles. Étrangement, cela s'accompagne d'une réduction de la tolérance à l'insuline. IL22 a pourtant montré à de nombreuses reprises un effet protecteur dans le développement de la NAFLD en réduisant l'expression des ERO, en contrôlant le microbiote intestinal et en régulant le métabolisme lipidique[376,462–464]. De plus IL22 promeut la réparation des tissus[465–467]; ce qui lui vaut d'ailleurs ses effets cancérogènes lorsqu'elle devient incontrôlée. Cependant d'autres études montrent qu'IL22 peut tout à fait avoir des effets pro-inflammatoires. Ainsi l'apport d'IL22 par infection adénovirale induit une réponse inflammatoire aiguë qui se traduit par la mobilisation des neutrophiles dans le sang, une surexpression de CXCL1 et de fibrinogène dans le foie[468]. Une ancienne étude sur cellules épithéliales de colon montre qu'une combinaison d'IL17 ou IL19 et IL22 induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL6 et IL8[469]. A une autre échelle, Elise Dalmas et al. ont observé que les patients atteints du diabète de type 2 ont une augmentation en cellules productrices d'IL17 et d'IL22 qui amplifie l'inflammation en induisant l'expression d'IL1 $\beta$ [470]. La **surexpression prolongée d'IL22** conduit donc à des effets secondaires qui vont amplifier l'inflammation et exacerber les dommages tissulaires.

En cela, les effets opposés de REG3A et IL22 sur la NAFLD malgré la confirmation d'un même impact de ces traitements sur le microbiote intestinal ne permet pas d'exclure le rôle de ce dernier dans l'amélioration des marqueurs hépatiques de nos animaux. Cependant, il vient modérer l'efficacité à laquelle on peut s'attendre d'un changement du microbiote chez des patients avec une maladie exacerbée. Afin de déterminer l'impact de notre traitement par LL-probiH1:IL22 sur le métabolisme et le système immunitaire de l'hôte, nous allons étudier l'expression des ARNm codant différents marqueurs pro-inflammatoires (cytokines, chemokines), impliqués dans la régulation des métabolismes lipidiques et glucidiques. Nous allons également vérifier l'expression des peptides antimicrobiens contrôlés par IL22 ainsi que l'expression des gènes associés à l'intégrité de la barrière intestinale (mucine, jonctions serrées).

## **Conclusion générale**

En conclusion, cette thèse décrit la capacité de *L.lactis* de servir de vecteur d'expression de peptides antimicrobiens. Nous constatons que *L. lactis* a une forte action protectrice en elle-même et que les peptides antimicrobiens exprimés au cours de nos études les ont amplifiés. Dans le cas de la cathélicidine, l'impact du traitement sur le microbiote intestinal semble avoir été moindre et l'amélioration des symptômes est due à une action immunomodulatrice directe. Par contraste, REG3A a eu un impact considérable sur la composition du microbiote. La causalité entre modification du microbiote et réduction de la prise de poids et de la stéatose hépatique reste cependant à démontrer. Paradoxalement, IL22 a eu des effets aggravants sur la prise de poids et la stéatose hépatique. Cela est probablement dû à des effets secondaires néfastes liés à la surexpression prolongée d'IL22, favorisant les phénomènes pro-inflammatoires.

# Annexes



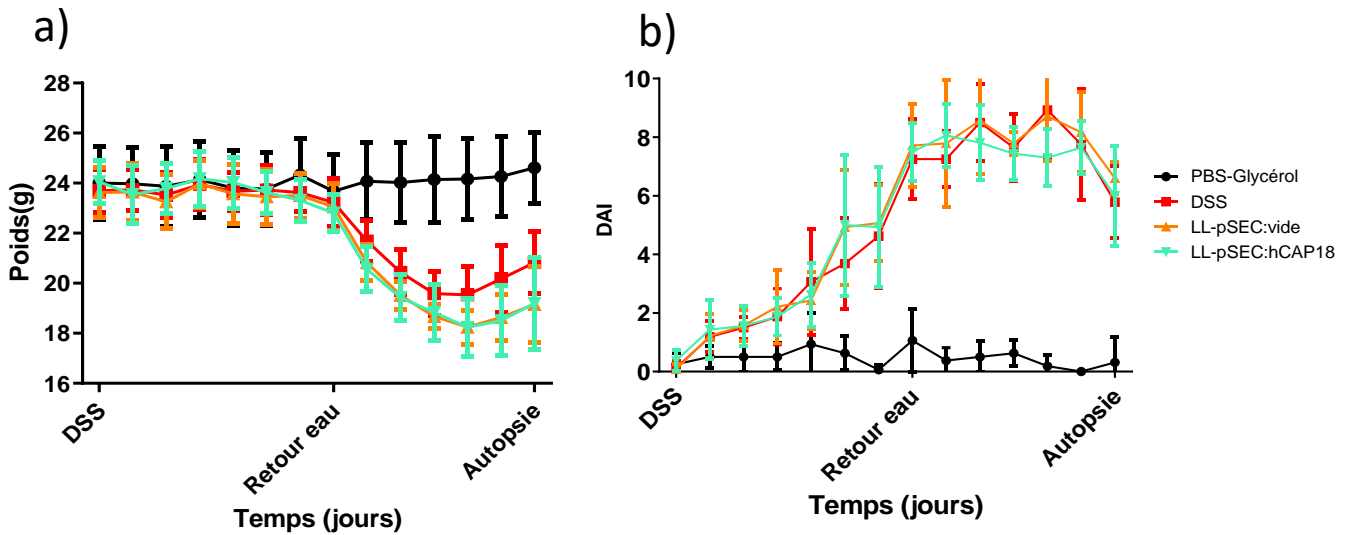


Figure supplémentaire 1. L'effet de *L.lactis* recombinant sécrétant hCAP18 sur la colite induite au DSS a) au niveau du poids b) et de l'indice d'activité de la maladie (DAI = disease activity index). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart-type. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001, n = 8 souris par groupe.

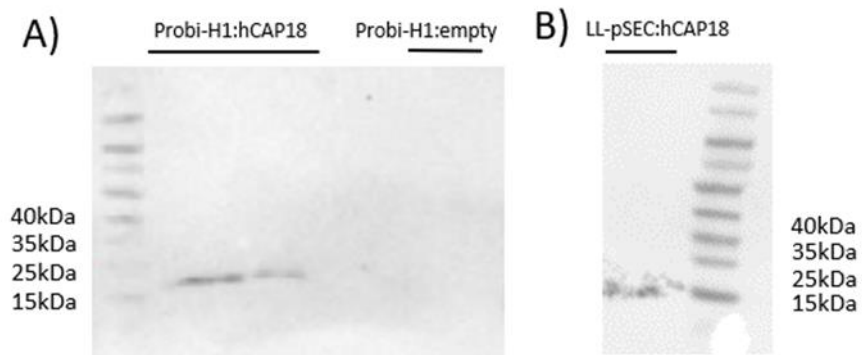


Figure supplémentaire 2. L'expression de hCAP18 A) induite par le vecteur Probi-H1:hCAP18 dans des cellules HEK293 et B) dans le culot de culture de bactéries LL-pSEC :hCAP18



# Possible Benefits of *Faecalibacterium prausnitzii* for Obesity-Associated Gut Disorders

Tatiani Uceli Maioli<sup>1,2†</sup>, Esther Borrás-Nogues<sup>2†</sup>, Licia Torres<sup>3</sup>, Sara Candida Barbosa<sup>3</sup>, Vinicius Dantas Martins<sup>3</sup>, Philippe Langella<sup>2</sup>, Vasco Ariston Azevedo<sup>4</sup> and Jean-Marc Chatel<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>2</sup>Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis, Jouy-en-Josas, France, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>4</sup>Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Patricia Machado Rodrigues Silva,  
Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ),  
Brazil

### Reviewed by:

Ben Woolbright,  
University of Kansas Medical Center,  
United States  
Su Meng,  
Hunan University, China

### \*Correspondence:

Jean-Marc Chatel  
jean-marc.chatel@inrae.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Inflammation Pharmacology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

Received: 13 July 2021

Accepted: 04 October 2021

Published: 02 December 2021

### Citation:

Maioli TU, Borrás-Nogues E, Torres L,  
Barbosa SC, Martins VD, Langella P,  
Azevedo VA and Chatel J-M (2021)  
Possible Benefits of *Faecalibacterium*  
*prausnitzii* for Obesity-Associated  
Gut Disorders.  
Front. Pharmacol. 12:740636.  
doi: 10.3389/fphar.2021.740636

Metabolic disorders are an increasing concern in the industrialized world. Current research has shown a direct link between the composition of the gut microbiota and the pathogenesis of obesity and diabetes. In only a few weeks, an obesity-inducing diet can lead to increased gut permeability and microbial dysbiosis, which contributes to chronic inflammation in the gut and adipose tissues, and to the development of insulin resistance. In this review, we examine the interplay between gut inflammation, insulin resistance, and the gut microbiota, and discuss how some probiotic species can be used to modulate gut homeostasis. We focus primarily on *Faecalibacterium prausnitzii*, a highly abundant butyrate-producing bacterium that has been proposed both as a biomarker for the development of different gut pathologies and as a potential treatment due to its production of anti-inflammatory metabolites.

**Keywords:** diabetes, gut permeability, obesity, probiotics, *Faecalibacterium prausnitzii*

## INTRODUCTION

Obesity has increased worldwide (Di Cesare et al., 2016) and is a public health concern across the globe. This disease is associated health outcomes such as diabetes, hypertension, and cancer (Arroyo-Johnson and Mincey, 2016). Currently, it is estimated that 30% of the global population is overweight, and this number continues to increase (Talukdar et al., 2020). The most prevalent consequence of obesity is insulin resistance and the development of type 2 diabetes (T2D). This condition is driven by inflammation that begins in adipose tissue. The hyperglycemia associated with obesity is linked with gut inflammation, increased permeability to bacterial products, and changes in microbiota composition that promote the cycle of inflammation associated with the obese state (Fallucca et al., 2014). Such pathogenic modifications of the community structure of gut microbiota are referred to as dysbiosis; one of the most well-known examples in the context of obesity is an increase in the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes in both mice and humans, which produces a pro-inflammatory profile characteristic of the obese microbiota (Kim et al., 2012; Verdam et al., 2013).

Diet has a direct influence on intestinal inflammation, which is related to weight gain and microbiota changes. A few weeks of a high-fat, high-sugar diet is enough to induce certain gut disorders, including increased gut permeability and dysbiosis (Cani et al., 2001b). After this it is possible to detect free lipopolysaccharides (LPS) in the blood, which triggers the activation of the innate immune system and inflammatory conditions (Guerville et al., 2017).

The development of hyperglycemia has been linked with a variety of alterations in the gut mucosa in addition to dysbiosis. These include increased gut permeability, altered expression of tight junction molecules, activation of innate immune molecules, and an increase in activated adaptive immune cells. All those changes characterize a “leaky gut,” the terminology used to collectively describe those gut alterations (De Kort et al., 2011). Together, these conditions can perturb gut homeostasis and increase the probability of developing an inflammatory disease such as Crohn’s disease.

Currently, the best diet-based strategy for treating these conditions is a shift from a Western-style diet to a balanced, plant-based diet. However, the implementation of such changes takes time and requires a very high level of nutritional education. Because of this, the success rates of weight loss maintenance due to lifestyle changes are typically low (Lewis and Abreu, 2017). In response, alternative treatments are being developed that aim to ameliorate the negative gut effects. One group of treatments that has demonstrated promise are probiotics, which in certain cases have been shown to decrease both gut permeability and glycemia (Barengolts, 2016; Xu et al., 2019).

*Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prau*) is a probiotic isolated from the human microbiota, where it is a dominant species in healthy adults. Its decline is associated with the development of chronic inflammation, as observed in cases of obesity. Multiple studies have demonstrated the anti-inflammatory properties of this bacterium (Feng et al., 2014; Andoh et al., 2016; Ganesan et al., 2018; Wrzosek et al., 2018), which are thought to be associated with its ability to produce butyrate. Butyrate activates the G-protein receptor (GPR) and thus facilitates downstream control of gut alterations during obesity and diabetes (Brown et al., 2003). Therefore, the goal of this review is to discuss the current state of knowledge regarding *F. prau*, particularly with respect to its potential as probiotic derived from human gut for use in alleviating the gut inflammation developed during obesity and hyperglycemia.

## OBESITY AND HYPERGLYCEMIA-ASSOCIATED GUT ALTERATIONS

Obesity is a highly complex, multifaceted disease associated with numerous metabolic dysfunctions. These include type 2 diabetes mellitus (T2DM), dyslipidemia, cardiovascular dysfunction, and chronic inflammatory diseases (Winer et al., 2016). These conditions are linked with changes in adipose tissue (AT), a complex endocrine organ that plays an important role in energy homeostasis due to its rapid and dynamic responses to changes in nutrient availability (Sun et al., 2011). Adipose tissue is composed of adipocytes, macrophages, lymphocytes, fibroblasts, cell progenitors, and endothelial cells, and is responsible for the secretion of molecules such as leptin, adiponectin, cytokines, and the vascular regulators angiotensin II and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) (Andersen et al., 2016).

In conditions of obesity, AT can become severely dysfunctional, with changes ranging from an increase in size to impaired function and atypical distribution in the body. This

results in a suite of physiological alterations, including modifications to the extracellular matrix, vascularization, levels of oxidative stress, the profile of secreted adipokines, and the inflammatory state of infiltrated immune cells (Jo et al., 2009). Due to the increase in free fatty acids (FFA), signaling pathways such as IKK $\beta$  and NF- $\kappa$ B are activated, along with those linked with Toll-like receptors (TLRs) (Crawford et al., 2009; Baker et al., 2011), which influence the inflammatory state. Obese patients are typically characterized by an increase in LPS that is accompanied by higher levels of TLR4 and CD14 expression, which all contribute to the proliferation of pro-inflammatory mechanisms (Winer et al., 2016).

The activation of TLRs is important in obesity, especially TLR4 (Winer et al., 2016), as these signaling pathways regulate the phosphorylation of proteins and lead to an increase in the production of molecules such as TNF- $\alpha$ , IL-6, leptin, resistin, and chemokines like type 2 CC chemokine receptor (CCR2), which is related to monocyte migration. TNF- $\alpha$  promotes the activation of the NF- $\kappa$ B pathway, stimulation of the cell death signaling pathway, inhibition of the expression of the glucose transporter GLUT-4, and an increase in FFA levels and consequent reduction in insulin sensitivity (Gomez-Hernandez et al., 2016).

Compared to their lean counterparts, mice that are fed a high-fat diet present a higher number of TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> cells and higher levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , mainly in adipose tissue (Lumeng et al., 2007). The infiltration of TCD8<sup>+</sup> cells in adipose tissue is followed by the accumulation of CX3CR1<sup>int</sup> macrophages, which migrate towards AT in response to greater amounts of FFAs, glucose, and apoptosis, thus increasing inflammation (Rocha et al., 2014). Adipose tissue macrophages (ATMs) infiltrate adipose tissue in a CCR2-dependent manner and inhibit the insulin signal in insulin-sensitive tissues, including liver, adipose tissue, and muscle (Hotamisligil, 2017; Kawano et al., 2016). Taken together, these conditions contribute to the production of pro-inflammatory cytokines and the release of monocyte 1 and 3 chemotactic protein (MCP-1 and MCP-3), which creates a cycle of continuous cell recruitment and constant inflammation in AT (Nishimura et al., 2009).

The inflammatory state in visceral adipose tissue, along with an excess of metabolites in the circulation, is a major driver of obesity-related insulin resistance (IR). IR is characterized by impaired phosphorylation of the insulin receptor in cells that depend on insulin. This results in increased serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) and activation of the SOCS (suppressor of cytokine signaling) protein, which reduces the insulin receptor’s ability to transmit signals downstream in the insulin pathway and to capture glucose in cells (Biddinger and Kahn, 2006).

When the full extent of metabolic dysfunction is considered, the physiological impact of obesity is wide-ranging, with numerous effects on the architecture and functionality of primary and secondary immune system organs, including bone marrow, thymus, and lymph nodes (Yang et al., 2009). The accumulation of lipids reduces hematopoiesis in bone marrow and thymopoiesis in the thymus, which is added to a restricted diversity of T cell receptor repertoires in the thymus

(Yang et al., 2009). In the peripheral immune response, there is a reduction in the migration of antigen-presenting cells to peripheral lymph nodes and a consequent reduction in the differentiation of naïve T cells into effective cells. These systemic effects can also translate into disturbances to the homeostasis of gut mucosa, which together with the mucosal-associated lymphoid tissue harbor the majority of immune cells found in the body.

The intestinal mucosa is the largest surface of the human body that is in contact with the external environment (Rezende and Weiner, 2017). The intestinal immune system is thus faced with an immense challenge: tolerating the vast amount of antigens that originate from the diet and the commensal microbiota while, at the same time, protecting against intestinal pathogens and toxins (Faria et al., 2017). Alterations in the intestinal barrier and dysbiosis in the gut of obese individuals may not only favor the development of diseases, but may also compromise immune tolerance to dietary antigens and the microbiota (Spiekermann and Walker, 2001; Faria and Weiner, 2005).

In the literature, there is an abundance of evidence on the many ways obesity and insulin resistance can affect immune responses and gut physiology. Obesity enhances jejunal inflammation and increases the density of macrophage populations, CD3+ T cells, intraepithelial lymphocytes and mature dendritic cells. It also increases the expression of pro-inflammatory cytokines (IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ), chemokines, and co-stimulatory factors in cells from the lamina propria and epithelial compartment. The increase in T-cell populations in the intestinal mucosa of obese subjects has also been associated with an impaired insulin response compared with lean subjects (Monteiro-Sepulveda et al., 2015). In humans with obesity and insulin resistance, there is a stronger inflammatory profile in the duodenum compared to non-obese patients, with more inflammatory cytokines and M1 macrophages (Ho-Plagaro et al., 2019). In addition, obesity and excess weight have been associated with increased gut permeability—demonstrated by increased serum concentrations of zonulin—along with microbiota modifications (Mörkl et al., 2018). Increased gut permeability was also reported in individuals with high levels of fasting glucose, as well as higher levels of pro-oxidative markers in the blood compared with healthier subjects (Carnevale et al., 2017). Furthermore, intestinal permeability was found to be sharply increased by a high-fat diet (HFD), probably mediated by a reduction in the expression of ZO-1 and occludin, which then favors the translocation of LPS through the intestinal wall (Cani et al., 2008b).

Hyperglycemia associated with HFD increases levels of IFN- $\gamma$ - and IL-17-producing inflammatory cells in the intestine and intestinal permeability, and decreases the abundance of regulatory cells (Luck et al., 2015). Even in the absence of excess weight, hyperglycemia has been associated with increased permeability and alterations in the mucosal immune system. For example, in *db/db* mice with controlled food intake or in mice treated with streptozotocin, high levels of blood glucose were associated with high intestinal permeability and increased expression of PRP (pathogen recognition patterns) in lymphoid organs (Thaiss et al., 2018). In other words, hyperglycemia that is

secondary to obesity, IR, or even T1D can further compromise intestinal health. Alterations in glucose metabolism can also decrease oral tolerance of antigens from the diet (Miranda et al., 2019) and increase the severity of food allergies (data not published) in mice.

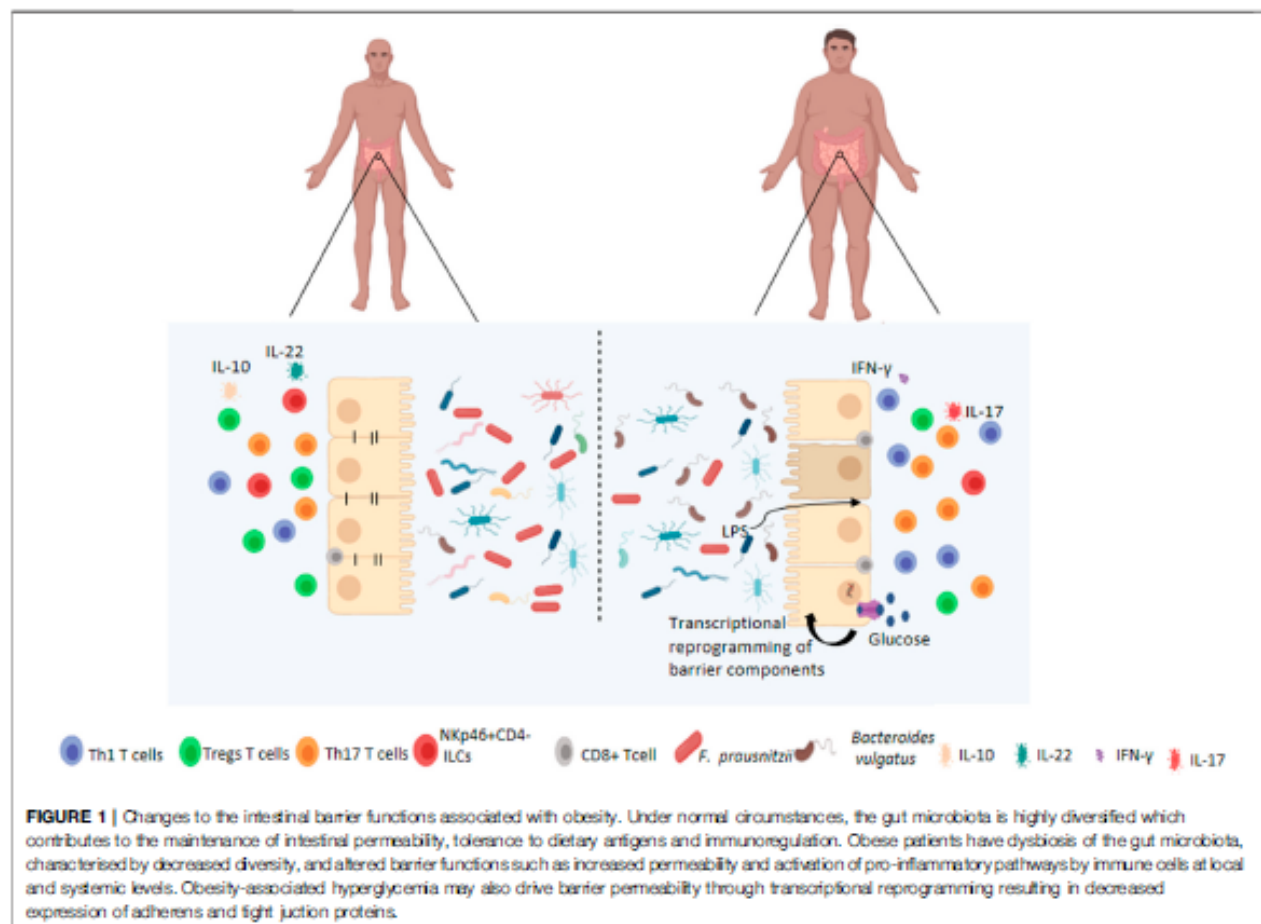
One of the main consequences of the development of inflammatory alterations and the breakdown of gut epithelial integrity is the leakage of bacterial products, including endotoxins such as LPS, across the intestinal epithelium. This then results in dysfunction of immune organs, inadequate distribution of leukocyte populations, and changes in lymphocyte activity, which can all affect the immune response against pathogens, regulation of the immune response to dietary antigens, and the intestinal microbiota (Figure 1).

## CHANGES IN GUT MICROBIOTA RELATED TO OBESITY AND HYPERGLYCEMIA

Composition of the microbiota is modulated by the availability of dietary nutrients that provide a wide variety of essential metabolites for the maintenance of intestinal architecture and integrity, while simultaneously acting on the modulation of immunity. In healthy conditions, Bacteroidetes and Firmicutes are the most abundant phyla of the microbial gut community. Although the structure of these communities can vary, some general patterns have been noted. For example, studies have determined that some of the most abundant intestinal bacterial species in healthy individuals tend to include members of the *Dorea/Eubacterium/Ruminococcus* groups as well as Bifidobacteria, Proteobacteria, and streptococci/lactobacilli (Eckburg et al., 2005; Qin et al., 2010).

Diet is the key determinant of microbiota composition; it modulates the abundance of various species and, consequently, their individual or collective functions. In humanized gnotobiotic mice, a shift from a low-fat, plant polysaccharide-rich diet to a high-fat and high-sugar diet had detectable effects on microbial community structure and metabolic pathways after only a single day. More specifically, the increase in body fat percentage in mice fed a high-fat diet was positively associated with the abundance of species in the genera *Lactococcus* and *Allobaculum* but was negatively associated with *Akkermansia* (Kolodziejczyk et al., 2019).

The alterations in the microbiota linked with HFD-induced obesity also have effects on gut permeability to bacteria and bacterial products. The Burcelin group (2008, 2011) described that after 1 week of HFD consumption, changes could be seen in the intestinal mucosa and microbiota such as co-localization of bacteria with dendritic cells (DCs) both in the mucosa and in the mesenteric lymph nodes. After 4 weeks of HFD consumption, clear increases in intestinal permeability have been noted, with a concomitant decrease in zonulin expression in the intestine. These changes were also dependent on changes in the microbiota (Cani et al., 2008b; Amar et al., 2011). These alterations in the intestine permit increased bacterial translocation, which involves intestinal phagocytes and requires the recognition of pathogen-associated molecular



patterns (PAMPs) by standard recognition receptors (PRRs), such as TLRs and nod-like receptors, to activate an innate immune response (Kim et al., 2012; Luck et al., 2015). Under pathological conditions. However, this molecular signaling process can favor further infiltration and cell accumulation in adipose tissue, triggering local inflammation.

The relationship between dysbiosis and gut permeability also plays a role in the development of insulin resistance. Specifically, alterations in the abundance of intestinal bacteria caused by chronically elevated glucose levels and obesity are known to result in dysfunction in the intestinal barrier (Guerville et al., 2017). As a result, high concentrations of gram-negative bacterial cell-wall products, such as LPS, can cross the intestinal barrier to reach other organs and tissues, and induce chronic inflammation (Cani et al., 2009). This can initiate a series of inflammatory mechanisms, setting in motion one of the main processes that leads to insulin resistance and ultimately T2D (Cani et al., 2007; Ganesan et al., 2018). This can be further exacerbated by the fact that the production of pro-inflammatory cytokines interferes with insulin secretion and the expression of insulin mRNA in human beta islet cells. Changes in the composition of the microbiota can thus play a multi-faceted role in

intestinal barrier dysfunction and, consequently, in metabolic disorders.

Certain groups of bacteria have been linked with various conditions in the gut. As mentioned earlier, an increased ratio of Firmicutes to Bacteroidetes in obese individuals has been related to inflammatory diseases (Turnbaugh et al., 2006), while conversely, the ratio of *Bacteroides* to *Prevotella* is lower in obese subjects than their lean counterparts. *F. prau* has been negatively associated with insulin resistance (Furet et al., 2010), while potential proinflammatory bacteria such as *Ruminococcus gnavus* or *Bacteroides* may dominate the microbiota of obese patients. In general, a reduction of butyrate-producing bacteria in obese subjects has been associated with an increase in mucus degradation (Cotillard et al., 2013). Obese women with high serum levels of zonulin, which is correlated with higher gut permeability, showed decreased abundance of Ruminococcaceae and *Faecalibacteri* both could weaken the gut barrier and lead to systemic inflammatory responses (Mörkl et al., 2018).

A study in mice reported that, after 1 week of HFD, and the subsequent early onset of diabetes, gram-negative bacteria start to adhere in the DCs of the gut mucosa; this increased bacterial

translocation and triggered inflammation (Amar et al., 2011). Interestingly, mice that are deficient in TLR5, which recognizes bacterial flagellin, develop obesity and features of metabolic syndrome even in the absence of a high-fat diet, solely as a function of microbiota changes (Vijay-Kumar et al., 2010). Finally, some bacterial species have been identified as particular promoters of insulin resistance, for example, *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus*, which were noted to be the main species driving the association between the biosynthesis of branched-chain amino acids and insulin resistance in humans (Pedersen et al., 2016).

One important function of the microbiota is the metabolism of polysaccharides, through which these bacteria produce a wide variety of metabolites, such as short-chain fatty acids (SCFAs), that are essential for the microbial population and for the maintenance of intestinal homeostasis (Sun et al., 2017). The SCFAs acetate, butyrate, and propionate are the main products of fermentation in the intestine, and are of particular interest due to their ability to activate local G-protein-coupled receptors (GPCR) in epithelial cells, especially GPR41 and GPR43 (Miyamoto et al., 2016). This process has feedback effects on the physiology of the intestinal microbiome and mediates chronic inflammation, affecting both glucose homeostasis and insulin sensitivity (Ang and Ding, 2016; Lambert et al., 2017). Butyrate-producing bacteria such as *F. prau* can reduce bacterial translocation and stimulate mucin secretion, which acts to maintain the integrity of the intestine (Ganesan et al., 2018).

Interactions between the intestinal microbiota and host cells require finely tuned control by the immune system, as specialized cells are needed to recognize bacterial fragments and induce inflammation when appropriate. A significant consequence of the microbial changes associated with obesity is activation of the innate immune system, which often results in chronic inflammation (Cani et al., 2007; Cani et al., 2008a). In animal models, increased levels of LPS in the bloodstream can directly damage pancreatic  $\beta$  cells and increase insulinitis by triggering the innate immune response; this is a crucial factor in the pathogenesis of insulin resistance (Ganesan et al., 2018). Similarly, Amar et al. (2011) reported that excess LPS fragments in the blood of diabetic mice induced adipose tissue inflammation.

Interestingly, when HFD experiments are performed in animals lacking the microbial pattern recognition receptors Nod1 or CD14, diet no longer has strong effects on bacterial permeability and translocation (Amar et al., 2011). Likewise, TLR4-knockout mice have a completely different microbiota and display elevated blood LPS levels and diabetes development compared to WT controls. These alterations in gut morphology and microbiota composition are also correlated with lower levels of circulating SCFAs, which suggests an interaction between intestinal functions, microbiota composition, and the development of diabetes (Simon et al., 2020).

Taken together, the changes to the structure and function of the gut microbiota that occur in cases of obesity and hyperglycemia have the potential to severely exacerbate mucosal inflammation and gut permeability. For this reason,

the use of bacterial probiotics—especially those known to produce high levels of SCFAs—could represent an interesting approach to treat the damage associated with intestinal metabolic syndrome.

## PROBIOTICS AS AN ALTERNATIVE TREATMENT FOR OBESITY AND HYPERGLYCEMIA

Modulation of the microbiota has become a regular and effective approach in the treatment and prevention of mucositis, colorectal cancer, neurological diseases, and several other disorders (Sanders et al., 2019). There are several ways to modify the microbiota, including diet alteration; the administration of probiotics, prebiotics, and postbiotics; and fecal microbiota transplantation. The underlying goal of all of these methods is the same: to modify the bacterial composition in the gut in order to provide benefits to the host. As the links between obesity, hyperglycemia, and alterations in the microbiota have become clearer, studies have attempted to shed light on the exact mechanisms by which diet is able to affect the microbiome. It is possible to envision that microbiota modulation could serve as a non-invasive means of treating metabolic conditions, especially obesity, and thus represent an attractive alternative to common approaches such as bariatric surgery.

As mentioned above, obesity-related dysbiosis induces a series of events, mainly in the intestine, that result in chronic inflammation and disruptions to intestinal homeostasis. However, until the early 2000s, there was no discussion of the possibility that the microbiota itself could contribute to weight gain (Backhed et al., 2004). The Gordon group has conducted research on this topic, and their pioneering studies proposed an interesting hypothesis—that the microbiome from obese subjects has an increased capacity to harvest energy from the diet. First, it was reported that control mice colonized with an “obese” microbiota present higher body fat compared to mice colonized with “lean” microbiota (Turnbaugh et al., 2006). Further studies with gnotobiotic germ-free C57BL/6 mice revealed that a Western diet induced a drop in microbiota diversity, with an increase in abundance of a single class of Firmicutes. In addition, when the microbiota from conventionally raised obese mice were transplanted into wild-type mice, they showed a greater increase in body fat (Turnbaugh et al., 2008). Finally, a fascinating study with adult monozygotic and dizygotic twins showed that, although twins shared a core microbiota, obese siblings had less diversity in their microbial assemblages, lower proportions of Bacteroidetes, and a higher proportion of Actinobacteria compared to their leaner twins (Turnbaugh et al., 2009). These interesting findings have led to the generation of several hypotheses, with one of the most intriguing being that microbiota modulation by itself might be an effective treatment for obesity.

The relationship between gut microbiota and energy balance (and thus the development of larger adipose tissue) is complex because it involves many factors, such as diet, gender, and culture, among others. However, recent studies have pointed to the gut

microbiome as a key element in the regulation of food absorption; there is evidence that the gut microbiota can affect hormone secretion directly in the brain, in areas that are responsible for controlling appetite, fat storage, and energy expenditure (Cerdó et al., 2019). Although the science is far from settled on the topic, based on these initial results, some attempts have been made to treat obesity by modifying the host microbiota.

To date, probiotics and prebiotics have been used for the treatment of obesity in both experimental models and clinical trials. Probiotics are live microorganisms that, when ingested, can confer benefits on the host, while prebiotics are molecules or components (such as food fiber) that are capable of modifying the composition of the intestinal bacterial assemblage or stimulating the activity of one or a limited number of bacterial species in a positive way (Gibson et al., 2017). In most cases, one of the noted benefits of both prebiotics and probiotics is increased levels of SCFAs, which have regulatory effects and are important for intestinal integrity. Much research has focused on the positive effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in obesity; both bacteria have been reported to contribute to weight loss and a reduction in insulin resistance. For instance, several studies involving different mouse or rat models of obesity have shown positive results from treatment with certain strains of *L. plantarum* (DSM 15313, Strain No. 14, and TL8), such as less weight gain, reduced adiposity, and higher insulin sensitivity (Axling et al., 2012; Ben Salah et al., 2013; Okubo et al., 2013). A recent publication reported that *L. plantarum* LMT1-48 significantly reduced weight in HFD-fed mice and its extract was capable of inhibiting the differentiation of adipocytes through downregulation of genes such as PPAR- $\gamma$  (Choi et al., 2020). Notably, synergistic effects were observed from a probiotic combination of *L. plantarum* KY1032 and *L. curvatus* HY7601; HFD-fed mice treated with this mixture showed reduced body weight gain and fat accumulation, lower levels of insulin and cholesterol, and fewer biomarkers for inflammation (Park et al., 2013; Yoo et al., 2013). One exception was reported with HFD-fed mice treated with *L. plantarum* DSM 15313, which showed an increase in body weight despite lower levels of glucose in plasma (Andersson et al., 2010). Another study, with *L. plantarum* NCIM8826, found no effect on body weight (Martincic et al., 2018). Overall, numerous strains—including *L. paracasei* CNCM I-4034, *L. casei* IMVB-7280, *L. paracasei* H1101, *L. casei* IBS041, *L. rhamnosus* CGMCC1.3, *L. rhamnosus* PB01 (DSM 14870), and *L. rhamnosus* LA68, among others—have demonstrated probiotic potential in studies of obesity, inducing positive effects such as reduced weight gain, less adiposity with less white adipose tissue, and reduced cholesterol levels, as reviewed by Ejtahed et al. (Ejtahed et al., 2019).

Avolio and colleagues et al showed that HFD-fed hamsters treated with a probiotic mix of six species (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *B. lactis*, and *L. reuteri*) presented a reduction in body weight and reduced levels of inflammatory factors in the blood compared to control HFD animals (Avolio et al., 2019). A study of leptin-deficient mice (ob/ob mice) showed that administration of the plant-derived lactic acid bacterium *Pediococcus pentosaceus* was sufficient to reduce adipocyte size and liver triglyceride content (Zhao et al., 2012).

Similarly, HFD-fed mice treated with *L. plantarum* demonstrated reduced adipose tissue and triglyceride levels; the treatment also reduced the Firmicutes/Bacteroidetes ratio and improved the gut microbiota composition (Joung et al., 2021). Finally, although most effort to date has focused on bacteria, the most-studied yeast probiotic, *Saccharomyces boulardii*, has been reported to reduce hepatic steatosis and hepatic inflammation in db/db mice (Everard et al., 2014).

Positive results are also being reported from obese mice treated with various types of prebiotics. For example, the use of oligofructose as a prebiotic in HFD-fed obese mice resulted in higher numbers of intestinal *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* in treated mice; this correlated with higher zonulin expression, leading to less intestinal permeability and less hepatic inflammation (Cani et al., 2008b). The addition of oligofructose in the diet was also found to promote satiety in HFD-fed mice, contributing to a reduction in both weight and adipose tissue deposits (Cani et al., 2005; Régnier et al., 2021). Another study showed that short-chain fructose-oligosaccharides induced a significant increase in the abundance of *Bifidobacteria* in obese mice, and these animals gained less weight than control HFD mice (Respondek et al., 2013). In general, the use of prebiotics as a treatment for obesity seems quite promising; this is especially true for approaches using food fiber, which seems to increase the production of satiety hormones, thus helping to control weight and increasing sensitivity to insulin (Parnell et al., 2012).

In humans, several clinical trials of probiotics and prebiotics as a treatment for obesity have reported positive results. For example, a randomized, double-blind study conducted by Osterberg and collaborators demonstrated that administration of a probiotic containing eight strains of bacteria (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Streptococcus*) attenuated increases in body mass index (BMI) and adipose tissue in subjects on a high-fat diet (Boutagy et al., 2015). Similarly, other studies of interventions with *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. have reported positive results in obese and overweight subjects, such as less body weight and less fat storage (Minami et al., 2015; Madjd et al., 2017). Two recent systematic reviews concluded that some probiotic strains are effective in reducing BMI and hip circumference (Shirvani-Rad et al., 2021; Tomé-Castro et al., 2021).

Despite the promising results thus far, there is still much room for new approaches and improvements, especially those aimed at elucidating the mechanisms by which various probiotics and prebiotics induce reductions in weight and inflammation. In this context, the probiotic derived from human gut *F. prau* may prove particularly useful.

## F. PRAU AS A NEW TREATMENT TO IMPROVE GUT HOMEOSTASIS DURING OBESITY AND IR

*F. prau* is a Gram-positive bacterium belonging to the Ruminococcaceae family, in *Clostridium* cluster IV. It is one of the most abundant species found in the gut, representing between 1 and 6% of the total fecal microbiota (Hold et al., 2003). Multiple



studies have described its anti-inflammatory properties and its role in tissue damage repair and protection against colitis (Sokol et al., 2008; Martín et al., 2014; Rossi et al., 2015), which appear to be related, at least in part, to its ability to produce butyrate (Zhou et al., 2018). *F. prau* is characterized by great intra-species diversity; indeed, it has been suggested that the genomic disparities are great enough to warrant separating the group into at least two different species: *F. prau sensu stricto* and *F. moorei* sp. nov. (Fitzgerald et al., 2018).

Patterns of abundance of *F. prau* and its different phylogroups have been associated with various pathologies of the gut. For example, IBD patients were found to host reduced phylotype richness of *F. prau* compared to a healthy group. Specifically, total levels of *F. prau* phylogroup I were reduced, and this pattern could be used to accurately differentiate IBD and colorectal cancer patients from healthy subjects; instead, phylogroup II was specifically reduced in Crohn's disease (CD) patients. Interestingly, *F. prau* prevalence was found to be reduced locally in either the ileum, colon, or rectum depending on the form of the patient's CD (Lopez-Siles et al., 2016). Taken together, this demonstrates the potential applications of *F. prau* phylotypes as biomarkers for the diagnosis and prognosis of patients.

As discussed earlier, diversity of the microbiota is lower in obese patients, and *F. prau* has been implicated in these changes in community composition. For example, analysis of a Chinese cohort revealed a reduced abundance of *Bacteroides*, *Akkermansia* (another butyrate-producing bacterium), and *F. prau* in T2D patients. Evidence of this shift was even detectable in pre-diabetic obese patients, reflecting the link between glucose intolerance and microbiota composition (Zhang et al., 2013). These results—especially with respect to *F. prau*—were corroborated in a later Iranian study, which also reported a negative correlation between *F. prau* count and BMI (Navab-Moghadam et al., 2017). In another study, though, *F. prau* was found to be enriched in patients suffering from T2D after weight loss (Hippe et al., 2016). Thus, although the exact mechanisms have yet to be determined, the current state of research supports a link between BMI, blood glucose levels, and the abundance of *F. prau*.

Another interesting finding with respect to *F. prau* was the observation of differences in gut composition on the basis of gender, especially for this bacterium and streptococci. In a population of obese Chinese patients, a positive correlation was found between *F. prau* abundance and fasting glucose levels in men but not in women (Aguirre de Cárcer et al., 2011).

Rapid improvements (on the scale of a few days) have been observed in the community structure of gut microbiota as a result of nutritional interventions. Diets rich in non-digestible carbohydrates, such as inulin-type fructans, fructooligosaccharides, polydextrose, soluble corn fiber, and raffinose, have been observed to increase the abundance of *F. prau* (Verhoog et al., 2019). Supplements can also be effective; for example, kiwifruit-based supplementation was noted to increase *F. prau* abundance in the gut as well as stool frequency in humans (Rush et al., 2002; Blatchford et al., 2017).

Alternatively, supplementation with *F. prau* itself could have potential in the treatment of obesity and its associated disorders. HFD-fed mice that were treated twice a week with *F. prau* displayed decreased hepatic inflammation, with fewer lipids accumulated in the liver, as well as a reduction in cell infiltration of adipose tissue and adipocyte size compared to controls (Munukka et al., 2017).

Finally, many studies have examined the mechanisms by which *F. prau* exerts its beneficial impacts on the intestinal health of obese individuals (Figure 2). It appears that these effects may not only be a function of the abundance of this bacterium in the intestine, but also of the quantity and type of metabolites it produces, such as butyrate. Indeed, some of these metabolites have already demonstrated promise for the treatment of obesity and T2D (Ganesan et al., 2018; Verhoog et al., 2019).

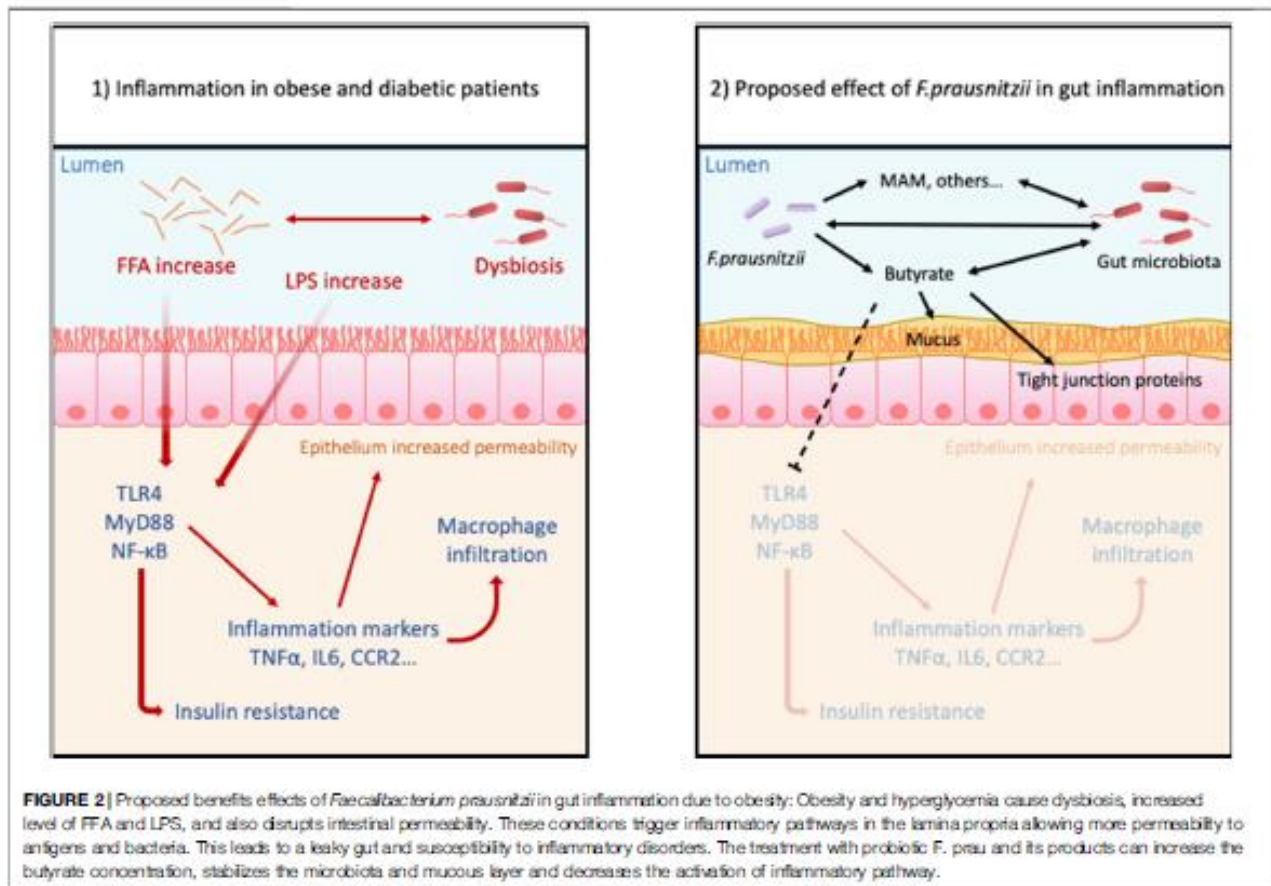
## F. PRAU ACTION THROUGH BUTYRATE PRODUCTION

*F. prau* is one of the most abundant butyrate-producing bacteria in human feces (Hold et al., 2003), and this SCFA is currently the subject of intense research focused on its positive health effects. For example, butyrate can prevent HFD-induced insulin insensitivity through epigenetic regulation that increases mitochondrial beta-oxidation, thus improving glucose sensitivity and adiposity (Fernandes et al., 2014).

The butyrate-containing supernatant of *F. prau* has been found to regulate Th17/Treg differentiation through inhibition of the IL-6 and STAT3/IL-17 proinflammatory pathway, specifically by targeting histone deacetylase 1 (HDAC1) (Rivière et al., 2016; Zhou et al., 2018). Although this mechanism was demonstrated in a colitis model, this proinflammatory pathway is also involved in obesity (Hippe et al., 2016). These results are consistent with the observation that HFD-mice treated with *F. prau* have improved hepatic health and reduced inflammation in adipose tissue (Munukka et al., 2017).

The anti-inflammatory properties of butyrate, and by extension *F. prau*, have long been known to be beneficial to IBD patients (JM et al., 1989; W et al., 1992; Scheppach, 1996). A recent clinical study found that administration of encapsulated sodium butyrate altered patients' gut microbiota by increasing the abundance of SCFA-producing bacteria in ulcerative colitis patients and butyrate-producing bacteria in Crohn's disease patients, with the former group reporting an increased quality of life (Facchin et al., 2020). Sodium butyrate supplementation also had positive effects on HFD-fed mice by altering the composition of the gut microbiota, lowering serum LPS concentration, and reducing HFD-induced inflammation (Zhou et al., 2017).

The A2-165 strain of *F. prau* has been found to induce a distinct cytokine response, with high IL-10 secretion compared to other *F. prau* strains tested (Rossi et al., 2016). This may be the result of higher butyrate production, which is known to induce IL-10 responses in Th1 cells (Sun et al., 2018). Indeed, a recent study demonstrated that this strain's anti-inflammatory



**FIGURE 2 |** Proposed benefits effects of *Faecalibacterium prausnitzii* in gut inflammation due to obesity: Obesity and hyperglycemia cause dysbiosis, increased level of FFA and LPS, and also disrupts intestinal permeability. These conditions trigger inflammatory pathways in the lamina propria allowing more permeability to antigens and bacteria. This leads to a leaky gut and susceptibility to inflammatory disorders. The treatment with probiotic *F. prau* and its products can increase the butyrate concentration, stabilizes the microbiota and mucous layer and decreases the activation of inflammatory pathway.

properties in primary human colonic mucosal barrier cells are primarily due to the downregulation of TLR3 and TLR4 by butyrate (Zhang et al., 2021). It thus seems likely that differences in the cytokine profile induced by strain A2-165 compared to other strains of *F. prau* can be at least partially explained by higher butyrate production.

However, gaps remain in our understanding of *F. prau*'s butyrate metabolism and its effects on patients' health, with some studies reporting inconsistent results. For example, an early study in southern India found significantly higher abundances of *F. prau* in obese children compared to non-obese children (Balamurugan et al., 2010). Similarly, Pinto et al. (2017) found increased levels of *F. prau* in T1D patients. They showed that the high abundance of the gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in the gut proteome of their T1D cohort could be attributed to two strains of *F. prau* and hypothesized that this was due to low levels of glycolytic sources in the diets of T1D patients and a lack of acetate—necessary for butyrate production—from other bacterial sources such as *Bifidobacterium* spp. (Pinto et al., 2017). This hypothesis was supported by the finding that co-culture with strains of *Bifidobacterium* improved growth, gut colonization, and butyrate production of *F. prau*. Administration of the co-culture supernatant to mice decreased DSS-induced

inflammation, providing further evidence that the beneficial properties of *F. prau* are dependent on its surrounding environment and interactions with other species (Ganesan et al., 2018; Kim et al., 2020).

Interestingly, a 2016 study reported that samples from lean patients contained the highest count of *F. prau* genes compared to obese and T2D patients, but the lowest content of the *F. prau*-associated butyryl-CoA:acetate CoA-transferase (BUT) gene. Instead, T2D patients demonstrated the highest BUT content. This was interpreted as evidence that different phylotypes of *F. prau* produce different levels of butyrate *in vivo* and that their abundance differs from healthy to unhealthy patients (Hippe et al., 2016). It seems paradoxical that higher butyrate production by *F. prau* would be associated with obesity and T2D. The authors hypothesized that, while certain levels of butyrate production can be protective in obese patients, greatly increased production can lead to inflammation in the gut and the development of T2D. The dose-dependent effect of butyrate on epithelium permeability has long been supported by work using transepithelial electrical resistance measurements; experiments on Caco-2 cells showed protective effects at 2 mM and detrimental effects at 8 mM of butyrate (Peng et al., 2007). Similarly, a Belgian study on primary cell monolayers from ulcerative colitis patients found that although butyrate had

protective effects in control non-inflamed tissue, it actually worsened inflammation when administered together with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , resulting in a dramatic increase in IL-8 production (Vancamelbeke et al., 2019).

*F. prau* has been associated with the production of several other metabolites, including shikimic and salicylic acids, known for their antimicrobial activity, and  $\alpha$ -ketoglutaric acid, which is involved in ammonia recycling and cell proliferation and differentiation, and known to be depleted in patients with gut dysbiosis (Miquel et al., 2015). Investigation of these other metabolites has become all the more relevant given a report that the ability of 13 different strains to decrease IL-8 levels induced by TNF- $\alpha$  stimulation in HT-29 cells was not correlated either to growth ratio or butyrate production (Martín et al., 2017).

Quévrain et al. (2016) identified a family of peptides from *F. prau* that were all derived from the same protein, the microbial anti-inflammatory molecule (MAM). They demonstrated that the anti-inflammatory properties of MAM arose through inactivation of the NF- $\kappa$ B pathway. Later experiments in models of DNBS- and DSS-induced colitis validated the effects of MAM on NF- $\kappa$ B *in vivo* and demonstrated its ability to inhibit the Th1 and Th17 immune responses (Breyner et al., 2017).

A more recent investigation of MAM analyzed its effects in db/db mice, which do not express leptin receptors and which demonstrated a depressed abundance of *F. prau* in the gut. When these mice were supplemented with MAM produced by *E. coli*, this protein was found to interact with ZO-1 and other tight junction proteins. Furthermore, the transfection of MAM into a cell line was able to increase ZO-1 expression and restore epithelial barrier function (Xu et al., 2019). These results suggest that MAM could have potential as an alternative treatment for pathologies involving disturbances of the gut epithelium and gut permeability.

It has thus become evident that butyrate is far from the only metabolite implicated in the immunomodulatory properties of *F. prau*. The use of this bacterium as a preventive or complementary treatment for obesity- and T2D-related inflammation of the gut could be promising. However, we first need a better understanding of the optimal dosage of bacterial units and the effects of butyrate production on host health, as well as how *F. prau* and butyrate metabolism are affected by other gut bacteria.

## REFERENCES

Aguirre de Cárcer, D., Cuiv, P. O., Wang, T., Kang, S., Worthley, D., Whitehall, V., et al. (2011). Numerical Ecology Validates a Biogeographical Distribution and Gender-Based Effect on Mucosa-Associated Bacteria along the Human Colon. *ISME J.* 5, 801–809. doi:10.1038/ismej.2010.177

Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermúdez-Humarán, I. G., et al. (2011). Intestinal Mucosal Adherence and Translocation of Commensal Bacteria at the Early Onset of Type 2 Diabetes: Molecular Mechanisms and Probiotic Treatment. *EMBO Mol. Med.* 3, 559–572. doi:10.1002/emmm.201100159

Andersen, C. J., Murphy, K. E., and Fernandez, M. L. (2016). Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. *Adv. Nutr.* 7, 66–75. doi:10.3945/an.115.010207

Andersson, U., Bränning, C., Ahmá S., Molin, G., Alerfall, J., Önnings, G., et al. (2010). Probiotics Lower Plasma Glucose in the High-Fat Fed C57BL/6J Mouse. *Benef. Microbes* 1, 189–196. doi:10.3920/BM2009.0036

## FINAL CONSIDERATION

Obesity is a metabolic disease caused by several factors—genetic, environmental, hormonal, and behavioral—but mainly by excess energy intake. It predisposes patients to other diseases such as hypertension and type 2 diabetes, and it is also associated with disorders of intestinal homeostasis, such as increased permeability and dysbiosis. Non-surgical treatments for obesity include changes in lifestyle, diet, and medications, all of which tend to have low adherence by the patient and are rarely effective for weight control or even for shaping intestinal health. As a major factor associated with obesity and gut health, intestinal dysbiosis may be the key to the effectiveness of weight management and the control of its associated comorbidities. For this reason, several probiotics have been tested successfully for the control of obesity, and there is intense interest in the discovery of new potential treatments.

*F. prau* is well known as an abundant bacterium in the natural human microbiota whose abundance is reduced in obese individuals. In addition to being a high producer of butyrate, it has anti-inflammatory effects that contribute to intestinal homeostasis. Therefore, the use of *F. prau* or its derivative products may represent a good alternative for the treatment of intestinal disorders linked with obesity and its comorbidities. However, studies on dose, forms of administration, and mechanisms of action are still necessary in order to improve our understanding of the most appropriate use of this bacterium.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

TM contributed to design of the study and wrote the article. EB-N wrote sections of the article and drew the figure. LT, SB, and VM wrote sections in the first draft of the article. VA, PL and J-MC supervised and made critical reviews of the article. All authors approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)—CAPES-COFEUCB 934/19.

Andoh, A., Nishida, A., Takahashi, K., Inatomi, O., Imaeda, H., Bamba, S., et al. (2016). Comparison of the Gut Microbial Community between Obese and Lean Peoples Using 16S Gene Sequencing in a Japanese Population. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 59, 65–70. doi:10.3164/jcbs.15-152

Ang, Z., and Ding, J. L. (2016). GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation - Protective or Causative? *Front. Immunol.* 7, 28. doi:10.3389/fimmu.2016.00028

Arroyo-Johnson, C., and Mincey, K. D. (2016). Obesity Epidemiology Worldwide. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 45, 571–579. doi:10.1016/j.gtc.2016.07.012

Avolio, E., Fazzari, G., Zizza, M., De Lorenzo, A., Di Renzo, L., Alò, R., et al. (2019). Probiotics Modify Body Weight Together with Anxiety States via Pro-inflammatory Factors in HFD-Treated Syrian golden Hamster. *Behav. Brain Res.* 356, 390–399. doi:10.1016/j.bbr.2018.09.010

Axling, U., Olsson, C., Xu, J., Fernandez, C., Larsson, S., Ström, K., et al. (2012). Green tea Powder and Lactobacillus Plantarum Affect Gut Microbiota, Lipid Metabolism and Inflammation in High-Fat Fed C57BL/6J Mice. *Nutr. Metab. (Lond)* 9, 105–118. doi:10.1186/1743-7075-9-105

- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., et al. (2004). The Gut Microbiota as an Environmental Factor that Regulates Fat Storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15718–15723. doi:10.1073/pnas.0407076101
- Baker, R. G., Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2011). NF- $\kappa$ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metab.* 13, 11–22. doi:10.1016/j.cmet.2010.12.008
- Balamurugan, R., George, G., Kabeerdoss, J., Hepsiba, J., Chandraganasekaran, A. M., and Ramakrishna, B. S. (2010). Quantitative Differences in Intestinal Faecalibacterium Prausnitzii in Obese Indian Children. *Br. J. Nutr.* 103, 335–338. doi:10.1017/S0007114509992182
- Barends, E. (2016). Gut Microbiota, Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics in Management of Obesity and Prediabetes: Review of Randomized Controlled Trials. *Endocr. Pract.* 22, 1224–1234. doi:10.4158/EPI15157.RA
- Ben Salah, R., Trabelsi, L., Hamden, K., Chouayekh, H., and Bejar, S. (2013). Lactobacillus Plantarum TNS Exhibits Protective Effects on Lipid, Hepatic and Renal Profiles in Obese Rat. *Anaerobe* 23, 55–61. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.07.003
- Biddinger, S. B., and Kahn, C. R. (2006). FROM MICE TO MEN: Insights into the Insulin Resistance Syndromes. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 123–158. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.124723
- Blatchford, P., Stoklosinski, H., Eady, S., Wallace, A., Butts, C., Geary, R., et al. (2017). Consumption of Kiwifruit Capsules Increases Faecalibacterium Prausnitzii Abundance in Functionally Constipated Individuals: a Randomised Controlled Human Trial. *J. Nutr. Sci.* 6, e52. doi:10.1017/jns.2017.52
- Boutagy, N. E., Neilson, A. P., Osterberg, K. L., Smithson, A. T., Englund, T. R., Davy, B. M., et al. (2015). Probiotic Supplementation and Trimethylamine-N-Oxide Production Following a High-Fat Diet. *Obesity (Silver Spring)* 23, 2357–2363. doi:10.1002/oby.21212
- Breyner, N. M., Michon, C., de Sousa, C. S., Vilas Boas, P. B., Chain, F., Azevedo, V. A., et al. (2017). Microbial Anti-inflammatory Molecule (MAM) from Faecalibacterium Prausnitzii Shows a Protective Effect on DNBS and DSS-Induced Colitis Model in Mice through Inhibition of NF- $\kappa$ B Pathway. *Front. Microbiol.* 8, 114. doi:10.3389/fmicb.2017.00114
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., et al. (2003). The Orphan G Protein-Coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11312–11319. doi:10.1074/jbc.M211609200
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., et al. (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772. doi:10.2337/db06-1491
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., et al. (2008b). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57, 1470–1481. doi:10.2337/db07-1403
- Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Maton, N., and Delzenne, N. M. (2005). Oligofructose Promotes Satiety in Rats Fed a High-Fat Diet: Involvement of Glucagon-like Peptide-1. *Obes. Res.* 13, 1000–1007. doi:10.1038/oby.2005.117
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van De Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., et al. (2009). Changes in Gut Microbiota Control Inflammation in Obese Mice through a Mechanism Involving GLP-2-Driven Improvement of Gut Permeability. *Gut* 58, 1091–1103. doi:10.1136/gut.2008.165886
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., et al. (2008a). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57, 1470–1481. doi:10.2337/db07-1403
- Carnevale, R., Pastori, D., Nocella, C., Cammisotto, V., Baratta, F., Del Ben, M., et al. (2017). Low-grade Endotoxemia, Gut Permeability and Platelet Activation in Patients with Impaired Fasting Glucose. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 27, 890–895. doi:10.1016/j.numecd.2017.06.007
- Cerdó, T., García-Santos, J. G., Bermúdez, M., and Campoy, C. (2019). The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients* 11, 635. doi:10.3390/nu11030635
- Choi, W. J., Dong, H. J., Jeong, H. U., Ryu, D. W., Song, S. M., Kim, Y. R., et al. (2020). Lactobacillus Plantarum IMT1-48 Exerts Anti-obesity Effect in High-Fat Diet-Induced Obese Mice by Regulating Expression of Lipogenic Genes. *Sci. Rep.* 10, 869–9. doi:10.1038/s41598-020-57615-5
- Cottillard, A., Kennedy, S. P., Kong, I. C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., et al. (2013). Dietary Intervention Impact on Gut Microbial Gene Richness. *Nature* 500, 585–588. doi:10.1038/nature12480
- Crawford, P. A., Crowley, J. R., Sambandam, N., Muegge, B. D., Costello, E. K., Hamady, M., et al. (2009). Regulation of Myocardial Ketone Body Metabolism by the Gut Microbiota during Nutrient Deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11276–11281. doi:10.1073/pnas.0902366106
- De Kort, S., Keszthelyi, D., and Masclee, A. A. (2011). Leaky Gut and Diabetes Mellitus: What Is the Link? *Obes. Rev.* 12, 449–458. doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00845.x
- Di Cesare, M., Bentham, J., Stevens, G. A., Zhou, B., Danaei, G., Lu, Y., et al. (2016). Trends in Adult Body-Mass Index in 200 Countries from 1975 to 2014: a Pooled Analysis of 1698 Population-Based Measurement Studies with 19.2 Million Participants. *Lancet* 387, 1377–1396. doi:10.1016/S0140-6736(16)30054-X
- Eddburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635–1638. doi:10.1126/science.1110591
- Ejtahed, H.-S., Angoorani, P., Soroush, A.-R., Atlasi, R., Hasani-Ranjbar, S., Mortazavian, A. M., et al. (2019). Probiotics Supplementation for the Obesity Management: A Systematic Review of Animal Studies and Clinical Trials. *J. Funct. Foods* 52, 228–242. doi:10.1016/j.jff.2018.10.039
- Everard, A., Matamoros, S., Geurts, L., Delzenne, N. M., and Cani, P. D. (2014). Saccharomyces Boulardii Administration Changes Gut Microbiota and Reduces Hepatic Steatosis, Low-Grade Inflammation, and Fat Mass in Obese and Type 2 Diabetic Db/db Mice. *MBio* 5, e01011-14. doi:10.1128/mBio.01011-14
- Facchin, S., Vitulo, N., Calgato, M., Buda, A., Romualdi, C., Pohl, D., et al. (2020). Microbiota Changes Induced by Microencapsulated Sodium Butyrate in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Neurogastroenterol. Motil.* 32, e13914. doi:10.1111/nmo.13914
- Falluca, F., Porrata, C., Falluca, S., and Pianesi, M. (2014). Influence of Diet on Gut Microbiota, Inflammation and Type 2 Diabetes Mellitus. First Experience with Macrobiotic Ma-Pi 2 Diet. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 30 Suppl 1, 48–54. doi:10.1002/dmrr.2518
- Faria, A. M., and Weiner, H. L. (2005). Oral Tolerance. *Immunol. Rev.* 206, 232–259. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00280.x
- Faria, A. M. C., Reis, B. S., and Mucida, D. (2017). Tissue Adaptation: Implications for Gut Immunity and Tolerance. *J. Exp. Med.* 214, 1211–1226. doi:10.1084/jem.20162014
- Feng, J., Tang, H., Li, M., Pang, X., Wang, L., Zhang, M., et al. (2014). The Abundance of Fecal Faecalibacterium Prausnitzii in Relation to Obesity and Gender in Chinese Adults. *Arch. Microbiol.* 196, 73–77. doi:10.1007/s00203-013-0942-2
- Fernandes, J., Su, W., Rahat-Rozenbloom, S., Wolaver, T. M., and Comelli, E. M. (2014). Adiposity, Gut Microbiota and Faecal Short Chain Fatty Acids Are Linked in Adult Humans. *Nutr. Diabetes* 4, e121. doi:10.1038/nutd.2014.23
- Fitzgerald, C. B., Shkoporov, A. N., Sutton, T. D. S., Chaplin, A. V., Velayudhan, V., Ross, R. P., et al. (2018). Comparative Analysis of Faecalibacterium Prausnitzii Genomes Shows a High Level of Genome Plasticity and Warrants Separation into New Species-Level Taxa. *BMC Genomics* 19, 931. doi:10.1186/s12864-018-5313-6
- Furet, J. P., Kong, I. C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J. L., et al. (2010). Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery-Induced Weight Loss: Links with Metabolic and Low-Grade Inflammation Markers. *Diabetes* 59, 3049–3057. doi:10.2337/db10-0253
- Ganesan, K., Chung, S. K., Vanamala, J., and Xu, B. (2018). Causal Relationship between Diet-Induced Gut Microbiota Changes and Diabetes: A Novel Strategy to Transplant Faecalibacterium Prausnitzii in Preventing Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3720. doi:10.3390/ijms19123720
- Gibson, G. R., Huškins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Probiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 491–502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75
- Gómez-Hernández, A., Benoit, N., Díaz-Castroverde, S., and Escobedo, Ó. (2016). Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int. J. Endocrinol.* 2016, 1216783. doi:10.1155/2016/1216783
- Guerville, M., Leroy, A., Sinquin, A., Jaegerette, F., Michalski, M. C., and Boudry, G. (2017). Western-diet Consumption Induces Alteration of Barrier Function Mechanisms in the Ileum that Correlates with Metabolic Endotoxemia in Rats.

- Am J Physiol Endocrinol Metab* 313, E107–E120. doi:10.1152/ajpendo.00372.2016
- Harig, J. M., Soergel, K. H., Komorowski, R. A., and Wood, C. M. (1989). Treatment of Diversion Colitis with Short-Chain-Fatty Acid Irrigation. *N Engl J Med* 320, 23–28. doi:10.1056/NEJM198901053200105
- Hippe, B., Remely, M., Aumueller, E., Pointner, A., Magnet, U., and Haslberger, A. G. (2016). Faecalibacterium Prausnitzii Phylotypes in Type Two Diabetic, Obese, and Lean Control Subjects. *Benef Microbes* 7, 511–517. doi:10.3920/BM2015.0075
- Ho-Plagaro, A., Santiago-Fernandez, C., Garcia-Serrano, S., Rodriguez, C., Garrido-Sanchez, I., Escamilla, A., et al. (2019). A Lower Duodenal Immune Response Is Associated with an Increase of Insulin Resistance in Patients with Morbid Obesity. *Int J Obes* 44, 340–352. doi:10.1038/s41366-019-0458-1
- Hold, G. L., Schwertz, A., Aminov, R. I., Blaut, M., and Flint, H. J. (2003). Oligonucleotide Probes that Detect Quantitatively Significant Groups of Butyrate-Producing Bacteria in Human Feces. *Appl Environ Microbiol* 69, 4320–4324. doi:10.1128/AEM.69.7.4320-4324.2003
- Hotamisligil, G. S. (2017). Inflammation, Metaflammation and Immunometabolic Disorders. *Nature* 542, 177–185. doi:10.1038/nature21363
- Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A. E., et al. (2009). Hypertrophy And/or Hyperplasia Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol* 5, e1000324. doi:10.1371/journal.pcbi.1000324
- Joung, H., Chu, J., Kim, B. K., Choi, I. S., Kim, W., and Park, T. S. (2021). Probiotics Ameliorate Chronic Low-Grade Inflammation and Fat Accumulation with Gut Microbiota Composition Change in Diet-Induced Obese Mice Models. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 1203–1213. doi:10.1007/s00253-020-11060-6
- Kawano, Y., Nakae, J., Watanabe, N., Kikuchi, T., Tateya, S., Tamori, Y., et al. (2016). Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-dependent Manner. *Cel Metab* 24, 295–310. doi:10.1016/j.cmet.2016.07.009
- Kim, H., Jeong, Y., Kang, S., You, H. J., and Ji, G. E. (2020). Co-Culture with Bifidobacterium Catenulatum Improves the Growth, Gut Colonization, and Butyrate Production of Faecalibacterium Prausnitzii: In Vitro and In Vivo Studies. *Microorganisms* 8, 788. doi:10.3390/microorganisms8050788
- Kim, K. A., Gu, W., Lee, I. A., Joh, E. H., and Kim, D. H. (2012). High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. *PLoS One* 7, e47713. doi:10.1371/journal.pone.0047713
- Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., and Elinav, E. (2019). Diet-microbiota Interactions and Personalized Nutrition. *Nat. Rev. Microbiol* 17, 742–753. doi:10.1038/s41579-019-0256-8
- Lambertz, J., Weiskirchen, S., Iandert, S., and Weiskirchen, R. (2017). Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-alcoholic Liver Disease. *Front Immunol* 8, doi:10.3389/fimmu.2017.01159
- Lewis, J. D., and Abreu, M. T. (2017). Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 152, 398–e6. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.019
- Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Suris-Valls, R., Aldeguer, X., Sabat-Mir, M., Duncan, S. H., et al. (2016). Changes in the Abundance of Faecalibacterium Prausnitzii Phylogroups I and II in the Intestinal Mucosa of Inflammatory Bowel Disease and Patients with Colorectal Cancer. *Inflamm. Bowel Dis* 22, 28–41. doi:10.1097/MIB.0000000000000590
- Luck, H., Tsai, S., Chung, J., Clemente-Casares, X., Ghazarian, M., Revelo, X. S., et al. (2015). Regulation of Obesity-Related Insulin Resistance with Gut Anti-inflammatory Agents. *Cel Metab* 21, 527–542. doi:10.1016/j.cmet.2015.03.001
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007). Obesity Induces a Phenotypic Switch in Adipose Tissue Macrophage Polarization. *J. Clin Invest* 117, 175–184. doi:10.1172/JCI29881
- Madjd, A., Taylor, M. A., Delavari, A., Malekzadeh, R., Macdonald, I. A., and Farshchi, H. R. (2017). Beneficial Effects of Replacing Diet Beverages with Water on Type 2 Diabetic Obese Women Following a Hypo-Energetic Diet: A Randomized, 24-week Clinical Trial. *Diabetes Obes. Metab* 19, 125–132. doi:10.1111/dom.12793
- Martin, R., Chañ, F., Miquel, S., Lu, J., Gratadou, J. J., Sokol, H., et al. (2014). The Commensal Bacterium Faecalibacterium Prausnitzii Is Protective in DNBS-Induced Chronic Moderate and Severe Colitis Models. *Inflamm. Bowel Dis* 20, 417–430. doi:10.1097/01.MIB.0000440815.76627.64
- Martin, R., Miquel, S., Benevides, I., Bridonneau, C., Robert, V., Hudault, S., et al. (2017). Functional Characterization of Novel Faecalibacterium Prausnitzii Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of F. Prausnitzii as a Next-Generation Probiotic. *Front. Microbiol* 8, 1226. doi:10.3389/fmicb.2017.01226
- Martinic, A., Barouei, J., Bendika, Z., Mishchuk, D., Heeney, D. D., Martin, R., et al. (2018). Supplementation of Lactobacillus Plantarum Improves Markers of Metabolic Dysfunction Induced by a High Fat Diet. *J. Proteome Res* 17, 2790–2802. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00282
- Mirami, J., Kondo, S., Yanagisawa, N., Odamaki, T., Xiao, J. Z., Abe, F., et al. (2015). Oral Administration of Bifidobacterium Breve B-3 Modifies Metabolic Functions in Adults with Obese Tendencies in a Randomised Controlled Trial. *J. Nutr. Sci.* 4, e17. doi:10.1017/jns.2015.5
- Miquel, S., Leclerc, M., Martin, R., Chain, F., Lenoir, M., Raguideau, S., et al. (2015). Identification of Metabolic Signatures Linked to Anti-inflammatory Effects of Faecalibacterium Prausnitzii. *MBio* 6, 1–10. doi:10.1128/mBio.00300-15
- Miranda, M. C. G., Oliveira, R. P., Torres, L., Aguiar, S. L. F., Pinheiro-Rosa, N., Lemos, I., et al. (2019). Frontline Science Abnormalities in the Gut Mucosa of Non-obese Diabetic Mice Precede the Onset of Type 1 Diabetes. *J. Leukoc. Biol* 106, 513–529. doi:10.1002/JLB.3F1019-024RR
- Miyamoto, J., Hasegawa, S., Kasubuchi, M., Ichimura, A., Nakajima, A., and Kimura, I. (2016). Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *Int J. Mol. Sci.* 17 (4), 450. doi:10.3390/ijms17040450
- Monteiro-Sepulveda, M., Touch, S., Mendes-Sá, C., André, S., Poirou, C., Allatif, O., et al. (2015). Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cel Metab* 22, 113–124. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.020
- Mörkl, S., Iackner, S., Meintzer, A., Mangge, H., Lehofer, M., Habwachs, B., et al. (2018). Gut Microbiota, Dietary Intakes and Intestinal Permeability Reflected by Serum Zonulin in Women. *Eur. J. Nutr.* 57, 2985–2997. doi:10.1007/s00394-018-1784-0
- Munukka, E., Rintala, A., Toivonen, R., Nylund, M., Yang, B., Takanen, A., et al. (2017). Faecalibacterium Prausnitzii Treatment Improves Hepatic Health and Reduces Adipose Tissue Inflammation in High-Fat Fed Mice. *ISME J.* 11, 1667–1679. doi:10.1038/ismej.2017.24
- Navab-Moghadam, F., Sedighi, M., Khamseh, M. E., Alaei-Shahmiri, F., Talebi, M., Razavi, S., et al. (2017). The Association of Type II Diabetes with Gut Microbiota Composition. *Microb. Pathog.* 110, 630–636. doi:10.1016/j.micpath.2017.07.034
- Nishimura, S., Marabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., et al. (2009). CD8+ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nat. Med.* 15, 914–920. doi:10.1038/nm.1964
- Okubo, T., Takemura, N., Yoshida, A., and Sonoyama, K. (2013). KK/Ta Mice Administered Lactobacillus Plantarum Strain No. 14 Have Lower Adiposity and Higher Insulin Sensitivity. *Biosci. Microbiota Food Health* 32, 93–100. doi:10.12938/bmfh.32.93
- Park, D. Y., Ahn, Y. T., Park, S. H., Huh, C. S., Yoo, S. R., Yu, R., et al. (2013). Supplementation of Lactobacillus Curvatus HY7601 and Lactobacillus Plantarum KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. *PLoS One* 8, e59470. doi:10.1371/journal.pone.0059470
- Parnell, J. A., Raman, M., Rioux, K. P., and Reimer, R. A. (2012). The Potential Role of Probiotic Fibre for Treatment and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Associated Obesity and Insulin Resistance. *Liver Int* 32, 701–711. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02730.x
- Pedersen, H. K., Gudmundsdottir, V., Nielsen, H. B., Hyötyläinen, T., Nielsen, T., Jensen, B. A., et al. (2016). Human Gut Microbes Impact Host Serum Metabolome and Insulin Sensitivity. *Nature* 535, 376–381. doi:10.1038/nature18646
- Peng, L., He, Z., Chen, W., Holzman, I. R., and Lin, J. (2007). Effects of Butyrate on Intestinal Barrier Function in a Caco-2 Cell Monolayer Model of Intestinal Barrier. *Pediatr. Res* 61, 37–41. doi:10.1203/01.pdr.0000250014.92242.f3
- Pinto, E., Anselmo, M., Calha, M., Bottrill, A., Duarte, I., Andrew, P. W., et al. (2017). The Intestinal Proteome of Diabetic and Control Children Is Enriched

- with Different Microbial and Host Proteins. *Microbiology (Reading)* 163, 161–174. doi:10.1099/mic/0000412
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., et al. (2010). A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing. *Nature* 464, 59–65. doi:10.1038/nature08821
- Quévrain, E., Maubert, M. A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., et al. (2016). Identification of an Anti-inflammatory Protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a Commensal Bacterium Deficient in Crohn's Disease. *Gut* 65, 415–425. doi:10.1136/gutjnl-2014-307649
- Régner, M., Van Hul, M., Krauf, C., and Cani, P. D. (2021). Gut Microbiome, Endocrine Control of Gut Barrier Function and Metabolic Diseases. *J. Endocrinol.* 248, R67–R82. doi:10.1530/JOE-20-0473
- Repondék, F., Gerard, P., Bossis, M., Boschat, L., Bruneau, A., Rabot, S., et al. (2013). Short-Chain Fracto-Oligosaccharides Modulate Intestinal Microbiota and Metabolic Parameters of Humanized Gnotobiotic Diet Induced Obesity Mice. *PLoS One* 8, e71026. doi:10.1371/journal.pone.0071026
- Rezende, R. M., and Weiner, H. L. (2017). History and Mechanisms of Oral Tolerance. *Semin. Immunol.* 30, 3–11. doi:10.1016/j.smim.2017.07.004
- Rivière, A., Selak, M., Iantiri, D., Leroy, F., and De Vuyst, I. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front. Microbiol.* 7, 979. doi:10.3389/fmicb.2016.00979
- Rocha, V. Z., Folco, E. J., Ozdemir, C., Sheikine, Y., Christen, T., Sukhova, G. K., et al. (2014). CXCR3 Controls T-Cell Accumulation in Fat Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1374–1381. doi:10.1161/ATVBAHA.113.303133
- Rossi, O., Khan, M. T., Schwarzer, M., Hudcovic, T., Sruškova, D., Duncan, S. H., et al. (2015). *Faecalibacterium prausnitzii* Strain HFF-F and its Extracellular Polymeric Matrix Attenuate Clinical Parameters in DSS-Induced Colitis. *PLoS One* 10, e0123013. doi:10.1371/journal.pone.0123013
- Rossi, O., Van Berkel, L. A., Chain, F., Tanweer Khan, M., Taverne, N., Sokol, H., et al. (2016). *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 Has a High Capacity to Induce IL-10 in Human and Murine Dendritic Cells and Modulates T Cell Responses. *Sci. Rep.* 6, 18507–18512. doi:10.1038/srep18507
- Rush, E. C., Patel, M., Plank, L. D., and Ferguson, L. R. (2002). Kiwifruit Promotes Laxation in the Elderly. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 11, 164–168. doi:10.1046/j.1440-6047.2002.00287.x
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2019). Probiotics and Prebiotics in Intestinal Health and Disease from Biology to the Clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 605–616. doi:10.1038/s41575-019-0173-3
- Schepach, W. (1996). Treatment of Distal Ulcerative Colitis with Short-Chain Fatty Acid Enemas. A Placebo-Controlled Trial. German-Austrian SCFA Study Group. *Dig. Dis. Sci.* 41, 2254–2259. doi:10.1007/BF02071409
- Shirvani-Rad, S., Tabatabaei-Malazy, O., Mohseni, S., Hasani-Ranjbar, S., Soroush, A.-R., Hoseini-Tavassol, Z., et al. (2021). Probiotics as a Complementary Therapy for Management of Obesity: A Systematic Review. *Evidence-Based Complement Altern. Med.* 2021, 1–11. doi:10.1155/2021/6688450
- Simon, M. C., Reinbeck, A. L., Wessel, C., Heindirk, J., Jelenik, T., Kaul, K., et al. (2020). Distinct Alterations of Gut Morphology and Microbiota Characterize Accelerated Diabetes Onset in Nonobese Diabetic Mice. *J. Biol. Chem.* 295, 969–980. doi:10.1074/jbc.RA119.010816
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, I. G., Gratadoux, J. J., 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. doi:10.1073/pnas.0804812105
- Spiekermann, G. M., and Walker, W. A. (2001). Oral Tolerance and its Role in Clinical Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32, 237–255. doi:10.1097/00005176-200103000-00003
- Sun, K., Kusminski, C. M., and Scherer, P. E. (2011). Adipose Tissue Remodeling and Obesity. *J. Clin. Invest.* 121, 2094–1012101. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633177> (Accessed May 31, 2019). doi:10.1172/JCI45887
- Sun, M., Wu, W., Chen, L., Yang, W., Huang, X., Ma, C., et al. (2018). Microbiota-derived Short-Chain Fatty Acids Promote Th1 Cell IL-10 Production to Maintain Intestinal Homeostasis. *Nat. Commun.* 9, 3555. doi:10.1038/s41467-018-05901-2
- Sun, M., Wu, W., Liu, Z., and Gong, Y. (2017). Microbiota Metabolite Short Chain Fatty Acids, GPCR, and Inflammatory Bowel Diseases. *J. Gastroenterol.* 52, 1–8. doi:10.1007/s00535-016-1242-9
- Talukdar, D., Seenivasan, S., Cameron, A. J., and Sacks, G. (2020). The Association between National Income and Adult Obesity Prevalence: Empirical Insights into Temporal Patterns and Moderators of the Association Using 40 Years of Data across 147 Countries. *PLoS One* 15, e0232236. doi:10.1371/journal.pone.0232236
- Thaiss, C. A., Levy, M., Grosheva, I., Zheng, D., Soffer, E., Blacher, E., et al. (2018). Hyperglycemia Drives Intestinal Barrier Dysfunction and Risk for Enteric Infection. *Science* 359, 1376–1383. doi:10.1126/science.aar3318
- Tomé-Castro, X. M., Rodríguez-Arriata, M., Cardona, D., Rueda-Ruzafa, L., Molina-Torres, G., and Roman, P. (2021). Probiotics as a Therapeutic Strategy in Obesity and Overweight: A Systematic Review. *Brief. Microbes* 12, 5–15. doi:10.3920/BM2020.0111
- Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L., and Gordon, J. I. (2008). Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223. doi:10.1016/j.chom.2008.02.015
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., et al. (2009). A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins. *Nature* 457, 480–484. doi:10.1038/nature07540
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., and Gordon, J. I. (2006). An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* 444, 1027–1031. doi:10.1038/nature05414
- Vancamelbeke, M., Laeremans, T., Vanhove, W., Arnauts, K., Ramalho, A. S., Farré, R., et al. (2019). Butyrate Does Not Protect against Inflammation-Induced Loss of Epithelial Barrier Function and Cytokine Production in Primary Cell Monolayers from Patients with Ulcerative Colitis. *J. Crohn Colitis* 13, 1351–1361. doi:10.1093/ecco-jcc/jjz064
- Verdam, F. J., Fuentes, S., De Jonge, C., Zoetendal, E. G., Erbil, R., Greve, J. W., et al. (2013). Human Intestinal Microbiota Composition Is Associated with Local and Systemic Inflammation in Obesity. *Obesity (Silver Spring)* 21, E607–E615. doi:10.1002/oby.20466
- Verhoog, S., Taneri, P. E., Roa Diaz, Z. M., Marques-Vidal, P., Troup, J. P., Bally, L., et al. (2019). Dietary Factors and Modulation of Bacteria Strains of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii*: A Systematic Review. *Nutrients* 11, doi:10.3390/nu11071565
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., et al. (2010). Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-like Receptor 5. *Science* 328, 228–231. doi:10.1126/science.1179721
- Winer, D. A., Luck, H., Tsai, S., and Winer, S. (2016). The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metab.* 23, 413–426. doi:10.1016/j.cmet.2016.01.003
- Wolfgang, S., Hartmut, S., Thomas, K., Gian-Maria, P., Peter, B., Stefan, C., et al. (1992). Effect of Butyrate Enemas on the Colonic Mucosa in Distal Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 103, 51–56. doi:10.1016/0016-5085(92)91094-K
- Wrzosek, L., Ciocan, D., Borentain, P., Spatz, M., Puchois, V., Hugot, C., et al. (2018). Transplantation of Human Microbiota into Conventional Mice Durably Reshapes the Gut Microbiota. *Sci. Rep.* 8, 6854. doi:10.1038/s41598-018-25300-3
- Xu, J., Liang, R., Zhang, W., Tian, K., Li, J., Chen, X., et al. (2019). *Faecalibacterium prausnitzii*-derived Microbial Anti-inflammatory Molecule Regulates Intestinal Integrity in Diabetes Mellitus Mice via Modulating Tight Junction Protein Expression. *J. Diabetes* 12, 224–236. doi:10.1111/1753-0407.12986
- Yang, H., Youn, Y. H., Vandanmangar, B., Rood, J., Kumar, K. G., Butler, A. A., et al. (2009). Obesity Accelerates Thymic Aging. *Blood* 114, 3803–3812. doi:10.1182/blood-2009-03-213595
- Yoo, S. R., Kim, Y. J., Park, D. Y., Jung, U. J., Jeon, S. M., Ahn, Y. T., et al. (2013). Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in Combination Alter Hepatic Lipid Metabolism and Suppress Diet-Induced Obesity. *Obesity (Silver Spring)* 21, 2571–2578. doi:10.1002/oby.20428
- Zhang, J., Huang, Y.-J., Yoon, J. Y., Kemmitt, J., Wright, C., Schneider, K., et al. (2021). Primary Human Colonic Mucosal Barrier Crosstalk with Super

- Oxygen-Sensitive Faecalibacterium Prausnitzii in Continuous Culture. *Med* 2, 74–98. doi:10.1016/j.medj.2020.07.001
- Zhang, X., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., et al. (2013). Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS One* 8, e71108. doi:10.1371/journal.pone.0071108
- Zhao, X., Higashikawa, F., Noda, M., Kawamura, Y., Matoba, Y., Kumagai, T., et al. (2012). The Obesity and Fatty Liver Are Reduced by Plant-Derived *Pediococcus Pentosaceus* LP28 in High Fat Diet-Induced Obese Mice. *PLoS One* 7, e30696. doi:10.1371/journal.pone.0030696
- Zhou, D., Pan, Q., Xin, F. Z., Zhang, R. N., He, C. X., Chen, G. Y., et al. (2017). Sodium Butyrate Attenuates High-Fat Diet-Induced Steatohepatitis in Mice by Improving Gut Microbiota and Gastrointestinal Barrier. *World J. Gastroenterol* 23, 60–75. doi:10.3748/wjg.v23.i1.60
- Zhou, L., Zhang, M., Wang, Y., Dorfman, R. G., Liu, H., Yu, T., et al. (2018). Faecalibacterium Prausnitzii Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1. *Inflamm. Bowel Dis.* 24, 1926–1940. doi:10.1093/ibd/izy182

**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.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Maioli, Borrás-Nogues, Torres, Barbosa, Martins, Langella, Azevedo and Chatel. 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.

## Références

1. Haute Autorité de Santé (HAS). GUIDE-AFFECTION DE LONGUE DURÉE- Maladie de Crohn [Internet]. 2008. Available from: [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)
2. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis [Internet]. *J. Crohn's Colitis*. Oxford Academic; 2010 [cited 2021 Jun 11]. p. 7–27. Available from: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/4/1/7/402141>
3. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. *J Crohn's Colitis*. 2017;11:649–70.
4. Haute Autorité de Santé (HAS). GUIDE-AFFECTION DE LONGUE DURÉE - Rectocolite hémorragique évolutive [Internet]. 2008. Available from: [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)
5. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. Elsevier; 2017;390:2769–78.
6. EL A, MC A, N A, HE D, RA R, S G, et al. Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in Scotland: association with northern latitude and affluence. *Gastroenterology* [Internet]. *Gastroenterology*; 2004 [cited 2021 Aug 31];127:1051–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15480983/>
7. Khalili H, Huang ES, Ananthakrishnan AN, Higuchi L, Richter JM, Fuchs CS, et al. Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut* [Internet]. NIH Public Access; 2012 [cited 2021 Aug 31];61:1686. Available from: [/pmc/articles/PMC3418414/](http://pmc/articles/PMC3418414/)
8. V N, E M, A E, S L, C R, S R, et al. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. *Inflamm Bowel Dis*; 2006 [cited 2021 Aug 31];12:218–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16534424/>
9. CN B, A W, LW S, A M, M K, M J, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. *Am J Gastroenterol*; 2006 [cited 2021 Aug 31];101:1559–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16863561/>
10. Ng SC, Tang W, Ching JY, Wong M, Chow CM, Hui AJ, et al. Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-Pacific Crohn's and colitis epidemiology study. *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2013;145:158-165.e2.
11. SC N, GG K, W T, R B, B A, FE U, et al. Population Density and Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Population-Based Study in 13 Countries or Regions in Asia-Pacific. *Am J Gastroenterol* [Internet]. Wolters Kluwer Health; 2019 [cited 2021 Sep 2];114:107–15. Available from: <https://europepmc.org/article/med/30177785>
12. Legendre J. Microbiote intestinal et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Université Toulouse III Paul Sabatier; 2014.
13. Hébuterne X. Nutrition anti-inflammatoire et MICI : que dire à nos patients ? *Nutr Clin Métabolisme*. Elsevier Masson; 2019;33:126–30.
14. Mushtaq T, Ahmed SF. The impact of corticosteroids on growth and bone health. *Arch Dis Child* [Internet]. BMJ Publishing Group Ltd; 2002 [cited 2021 Sep 1];87:93–6. Available from: <https://adc.bmj.com/content/87/2/93>
15. Y Y, KC C, J C. Exclusive enteral nutrition versus corticosteroids for treatment of pediatric Crohn's disease: a



- meta-analysis. *World J Pediatr* [Internet]. *World J Pediatr*; 2019 [cited 2021 Sep 1];15:26–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30666565/>
16. Forbes A, Escher J, ebuterne XH, Kłe S, Krznaric Z, ephane Schneider S, et al. ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. 2017 [cited 2021 Sep 1]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2016.12.0270261-5614/>
17. JP H, M C, H Z, S L, JP C, J B, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* [Internet]. *Nature*; 2001 [cited 2021 Sep 1];411:599–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11385576/>
18. de Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2017 492 [Internet]. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Aug 25];49:256–61. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng.3760>
19. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 2015 479 [Internet]. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2021 Aug 25];47:979–86. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng.3359>
20. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* [Internet]. NIH Public Access; 2011 [cited 2021 Sep 1];474:307. Available from: </pmc/articles/PMC3204665/>
21. Venema WTU, Voskuil MD, Dijkstra G, Weersma RK, Festen EA. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality. *J Pathol* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [cited 2021 Sep 2];241:146–58. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.4817>
22. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2021 Sep 9];387:156–67. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673615004651/fulltext>
23. Gasche C, Grundtner P. Genotypes and phenotypes in Crohn's disease: do they help in clinical management? *Gut* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2005 [cited 2021 Sep 2];54:162. Available from: </pmc/articles/PMC1774386/>
24. Liu JZ, Anderson CA. Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2021 Sep 2];28:373. Available from: </pmc/articles/PMC4075408/>
25. Physiopathologie de la maladie de Crohn : l'indispensable pour le clinicien – FMC-HGE [Internet]. [cited 2021 Sep 1]. Available from: [https://www.fmcgastro.org/textes-postus/no-postu\\_year/physiopathologie-de-la-maladie-de-crohn-lindispensable-pour-le-clinicien/](https://www.fmcgastro.org/textes-postus/no-postu_year/physiopathologie-de-la-maladie-de-crohn-lindispensable-pour-le-clinicien/)
26. C C, M C, G DM, S DC, S A, P DA, et al. Novel X-Linked Inhibitor of Apoptosis Mutation in Very Early-Onset Inflammatory Bowel Disease Child Successfully Treated with HLA-Haploidentical Hemapoietic Stem Cells Transplant after Removal of  $\alpha\beta$  + T and B Cells. *Front Immunol* [Internet]. *Front Immunol*; 2017 [cited 2021 Sep 2];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29312354/>
27. Mudde ACA, Booth C, Marsh RA. Evolution of Our Understanding of XIAP Deficiency. *Front Pediatr. Frontiers*; 2021;0:557.
28. Zeissig Y, Petersen BS, Milutinovic S, Bosse E, Mayr G, Peuker K, et al. XIAP variants in male Crohn's disease. *Gut*. 2015;64:66–76.
29. Speckmann C, Ehl S. XIAP deficiency is a mendelian cause of late-onset IBD. *Gut* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2014 [cited 2021 Sep 2];63:1031–2. Available from: <https://gut.bmj.com/content/63/6/1031>
30. Almana Y, Mohammed R. Current concepts in pediatric inflammatory bowel disease; IL10/IL10R colitis as a model disease. *Int J Pediatr Adolesc Med* [Internet]. King Faisal Specialist Hospital and Research Centre; 2019

[cited 2021 Sep 2];6:1. Available from: [/pmc/articles/PMC6603158/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3531158/)

31. Okou DT, Kugathasan S. The Role of Genetics In Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. NIH Public Access; 2014 [cited 2021 Sep 2];20:1878. Available from: [/pmc/articles/PMC4201539/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24201539/)
32. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017 151 [Internet]. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Sep 9];15:39–49. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.136>
33. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2014;146:1489–99.
34. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn’s disease. *Lancet*. Elsevier; 2017;389:1741–55.
35. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet*. Elsevier; 2017;389:1756–70.
36. AN A, LM H, ES H, H K, JM R, CS F, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med* [Internet]. *Ann Intern Med*; 2012 [cited 2021 Sep 3];156:350–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22393130/>
37. JA C, E T, C S, SK C, J T, PP T. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. *Am J Gastroenterol*; 2008 [cited 2021 Sep 3];103:2394–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18684177/>
38. H K, LM H, AN A, JE M, D F, JM R, et al. Hormone therapy increases risk of ulcerative colitis but not Crohn’s disease. *Gastroenterology* [Internet]. *Gastroenterology*; 2012 [cited 2021 Sep 3];143:1199–206. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22841783/>
39. DK A, S D, K M, G S, P L, G G, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn’s disease in children. *Am J Gastroenterol* [Internet]. *Am J Gastroenterol*; 2007 [cited 2021 Sep 3];102:2016–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17617201/>
40. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, Silva P de, Fuchs CS, et al. Long-term Intake of Dietary Fat and Risk of Ulcerative Colitis and Crohn’s Disease. *Gut* [Internet]. NIH Public Access; 2014 [cited 2021 Sep 6];63:776. Available from: [/pmc/articles/PMC3915038/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/243915038/)
41. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2021 Sep 7];157:647-659.e4. Available from: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508519367095/fulltext>
42. Marion-Letellier R, Amamou A, Savoye G, Ghosh S. Inflammatory Bowel Diseases and Food Additives: To Add Fuel on the Flames! *Nutrients* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2019 [cited 2021 Sep 6];11. Available from: [/pmc/articles/PMC6567822/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/356567822/)
43. L X, P L, Y K, B C, RW L, AN A. Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. *Aliment Pharmacol Ther*; 2017 [cited 2021 Sep 7];46:780–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28892171/>
44. P V, G BS, A DG, A C, S C, MT A, et al. Inadequate sunlight exposure in patients with inflammatory bowel disease. *J Dig Dis* [Internet]. *J Dig Dis*; 2018 [cited 2021 Sep 6];19:8–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29251424/>
45. V N, P J, MC B-R, E M, A W, V V, et al. Low exposure to sunlight is a risk factor for Crohn’s disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. *Aliment Pharmacol Ther*; 2011 [cited 2021 Sep 6];33:940–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21332762/>

46. Jantchou P, Clavel-Chapelon F, Racine A, Kvaskoff M, Carbonnel F, Boutron-Ruault MC. High residential sun exposure is associated with a low risk of incident Crohn's disease in the prospective E3N cohort. *Inflamm Bowel Dis*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014;20:75–81.
47. Froicu M, Cantorna MT. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunol* [Internet]. BioMed Central; 2007 [cited 2021 Aug 31];8:5. Available from: [/pmc/articles/PMC1852118/](http://pmc/articles/PMC1852118/)
48. Wang T-T, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ, Soualhine H, Tavera-Mendoza LE, et al. Direct and Indirect Induction by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> of the NOD2/CARD15-Defensin 2 Innate Immune Pathway Defective in Crohn Disease \* □ S. 2009 [cited 2018 Dec 14]; Available from: <http://www.jbc.org>
49. Wu S, Yoon S, Zhang Y-G, Lu R, Xia Y, Wan J, et al. Vitamin D receptor pathway is required for probiotic protection in colitis. *Am J Physiol Liver Physiol* [Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 14];309:G341–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26159695>
50. Froicu M, Zhu Y, Cantorna MT. Vitamin D receptor is required to control gastrointestinal immunity in IL-10 knockout mice. *Immunology* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2006 [cited 2021 Aug 31];117:310. Available from: [/pmc/articles/PMC1782241/](http://pmc/articles/PMC1782241/)
51. Sharifi A, Hosseinzadeh-Attar MJ, Vahedi H, Nedjat S. A randomized controlled trial on the effect of vitamin D<sub>3</sub> on inflammation and cathelicidin gene expression in ulcerative colitis patients. *Saudi J Gastroenterol* [Internet]. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2016 [cited 2018 Dec 12];22:316–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27488327>
52. MT C, C M, C B, BD M. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr* [Internet]. J Nutr; 2000 [cited 2021 Aug 31];130:2648–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11053501/>
53. R DP, D P, AK C, C F, F C. Association Between Inflammatory Bowel Disease and Vitamin D Deficiency: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. *Inflamm Bowel Dis*; 2015 [cited 2021 Sep 6];21:2708–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26348447/>
54. IS S, NA M, DM R, WA G, HW B, GG K. The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol* [Internet]. *BMC Gastroenterol*; 2012 [cited 2021 Sep 7];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22624994/>
55. GG K, J H, J K, BE S, R P, S G, et al. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol* [Internet]. *Am J Gastroenterol*; 2010 [cited 2021 Aug 31];105:2412–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20588264/>
56. AN A, EL M, DG B, K S. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. *Inflamm Bowel Dis*; 2011 [cited 2021 Aug 31];17:1138–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20806342/>
57. Beamish LA, Osornio-Vargas AR, Wine E. Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *J Crohn's Colitis* [Internet]. Oxford Academic; 2011 [cited 2021 Aug 31];5:279–86. Available from: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/5/4/279/653514>
58. Leong RW, Mitrev N, Ko Y. Hygiene Hypothesis: Is the Evidence the Same All Over the World? *Dig Dis* [Internet]. Karger Publishers; 2016 [cited 2021 Sep 6];34:35–42. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/442922>
59. SS M, KS M, RE S, CA H, S G. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* [Internet]. *Mayo Clin Proc*; 2006 [cited 2021 Sep 7];81:1462–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17120402/>
60. SC N, W T, RW L, M C, Y K, C S, et al. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-

based case-control study in Asia-Pacific. *Gut* [Internet]. *Gut*; 2015 [cited 2021 Sep 2];64:1063–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25217388/>

61. S R, I K, N A, T G. Lack of association between smoking and inflammatory bowel disease in Jewish patients in Israel. *Gastroenterology* [Internet]. *Gastroenterology*; 1995 [cited 2021 Sep 7];108:1683–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7768372/>

62. Y K, V K, M K, R B, D S, A A, et al. Inflammatory Bowel Disease Environmental Risk Factors: A Population-Based Case-Control Study of Middle Eastern Migration to Australia. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 2015 [cited 2021 Sep 2];13:1453-1463.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25771246/>

63. R U, CN B, R G, A H, KL K, MP K, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. *Am J Gastroenterol*; 2014 [cited 2021 Sep 2];109:1728–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25223575/>

64. DK A, P L, L L, A K, V C, F C, et al. Investigating the hygiene hypothesis as a risk factor in pediatric onset Crohn's disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. *Am J Gastroenterol*; 2006 [cited 2021 Sep 6];101:1005–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16573775/>

65. R D, V DL, G C, D M, A D, C M, et al. Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* [Internet]. *Am J Gastroenterol*; 1999 [cited 2021 Sep 13];94:2956–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10520851/>

66. Michielan A, D'Inca R. *Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut*. Mediators Inflamm. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015.

67. Johansson ME V, Jakobsson HE, Holmén-Larsson J, Schütte A, Ermund A, Rodríguez-Piñeiro AM, et al. Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell Host Microbe* [Internet]. NIH Public Access; 2015 [cited 2021 Sep 7];18:582. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26448652/>

68. M V der S, BA DK, AC DB, A V, JP M, JB VG, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* [Internet]. *Gastroenterology*; 2006 [cited 2021 Sep 8];131:117–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16831596/>

69. A V, W Y, J H, A F, C N, S V, et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* [Internet]. *Science*; 2002 [cited 2021 Sep 8];295:1726–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11872843/>

70. ME J, M P, J P, A V, L H, GC H. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2008 [cited 2021 Sep 8];105:15064–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18806221/>

71. S Z, N B, D G, J R, J M, U W, 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* [Internet]. *Gut*; 2007 [cited 2021 Sep 17];56:61–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16822808/>

72. SH L. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res* [Internet]. *Intest Res*; 2015 [cited 2021 Sep 14];13:11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25691839/>

73. M P, B G, D C, H N, Y G, G V, et al. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* [Internet]. *Gastroenterology*; 1997 [cited 2021 Sep 13];113:802–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9287971/>

74. BR Y, JB M. CD45RO expression on circulating CD19+ B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability. *Gastroenterology* [Internet]. *Gastroenterology*; 1995 [cited 2021 Sep 13];108:132–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7528696/>

75. GR M, LR S, JB M. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* [Internet]. *Gastroenterology*; 1993 [cited 2021 Sep 13];104:1627–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8500719/>
76. AG T, K V. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. *J Gastroenterol Hepatol*; 2009 [cited 2021 Sep 22];24:943–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19638078/>
77. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* 2019 431 [Internet]. SpringerOpen; 2019 [cited 2021 Sep 23];43:1–12. Available from: <https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-019-0227-2>
78. Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nuñez G. NOD-LRR PROTEINS: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133347> [Internet]. *Annual Reviews*; 2005 [cited 2021 Sep 22];74:355–83. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133347>
79. Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc; 2016 [cited 2022 Mar 6];22:2195. Available from: </pmc/articles/PMC4734996/>
80. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2009 [cited 2021 Sep 23];58:1152–67. Available from: <https://gut.bmj.com/content/58/8/1152>
81. Moldoveanu AC, Diculescu M, Braticevici CF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Rom J Intern Med*. 2015;53:118–27.
82. Mizoguchi A, Yano A, Himuro H, Ezaki Y, Sadanaga T, Mizoguchi E. Clinical importance of IL-22 cascade in IBD. *J Gastroenterol* [Internet]. Springer Japan; 2018 [cited 2019 Apr 19];53:465–74. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00535-017-1401-7>
83. Imam T, Park S, Kaplan MH, Olson MR. Effector T helper cell subsets in inflammatory bowel diseases. *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*; 2018.
84. Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. *Cureus* [Internet]. Cureus Inc.; 2017 [cited 2021 Sep 23];9. Available from: </pmc/articles/PMC5438231/>
85. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014 145 [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2021 Sep 24];14:329–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3661>
86. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2003 [cited 2021 Sep 23];18:1–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x>
87. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* [Internet]. BMJ Publishing Group; 1994 [cited 2021 Sep 23];35:1590–2. Available from: <https://gut.bmj.com/content/35/11/1590>
88. Castano-Milla C, Chaparro M, Gisbert J. Systematic review with meta-analysis: the declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39:645–59.
89. Matijašić M, Meštrović T, Paljetak HČ, Perić M, Barešić A, Verbanac D. Gut Microbiota beyond Bacteria—Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *Int J Mol Sci* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020 [cited 2021 Sep 8];21. Available from: </pmc/articles/PMC7215374/>
90. Frank DN, Amand AL St., Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic

characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. National Academy of Sciences; 2007 [cited 2021 Sep 7];104:13780–5. Available from: <https://www.pnas.org/content/104/34/13780>

91. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol* [Internet]. Public Library of Science; 2016 [cited 2021 Sep 7];14:e1002533. Available from: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002533>

92. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* [Internet]. NIH Public Access; 2006 [cited 2021 Sep 7];312:1355. Available from: </pmc/articles/PMC3027896/>

93. F B, RE L, JL S, DA P, JI G. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* [Internet]. Science; 2005 [cited 2021 Sep 7];307:1915–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15790844/>

94. Claus SP, Guillou H, Ellero-Simatos S. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? *npj Biofilms Microbiomes* 2016 21 [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2021 Sep 7];2:1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/npjbiofilms20163>

95. Guerre P. Mycotoxin and Gut Microbiota Interactions. *Toxins (Basel)* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020 [cited 2021 Sep 7];12. Available from: </pmc/articles/PMC7761905/>

96. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009 95 [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 [cited 2021 Sep 7];9:313–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri2515>

97. SH R, C P, EA M. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol; 2009 [cited 2021 Sep 7];6:306–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19404271/>

98. N S, Y C, Y A, J S, N O, XN Y, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* [Internet]. J Physiol; 2004 [cited 2021 Sep 13];558:263–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15133062/>

99. Lu J, Lu L, Yu Y, Cluette-Brown J, Martin CR, Claud EC. Effects of Intestinal Microbiota on Brain Development in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci Reports* 2018 81 [Internet]. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 Sep 13];8:1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-23692-w>

100. Shao Y, Forster SC, Tsaliki E, Vervier K, Strang A, Simpson N, et al. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2021 Jun 18];574:117–21. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1560-1>

101. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2021 Jun 18];22:250–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26828196/>

102. Yang J, Corwin EJ, Brennan PA, Jordan S, Murphy JR, Dunlop A. The infant microbiome: Implications for infant health and neurocognitive development. *Nurs Res* [Internet]. Lippincott Williams and Wilkins; 2016 [cited 2021 Jun 18];65:76–88. Available from: </pmc/articles/PMC4681407/>

103. Campeotto F, Waligora-Dupriet AJ, Doucet-Populaire F, Kalach N, Dupont C, Butel MJ. Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clin Biol*. Elsevier Masson; 2007;31:533–42.

104. Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol* 2017 31 [Internet]. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Sep 10];3:8–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41564-017-0072-8>

105. Pirzer U, Schönhaar A, Fleischer B, Hermann E, Meyer zum Buschenfelde KH. Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease. *Lancet*. Elsevier; 1991;338:1238–9.

106. Kuna AT. Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochem Medica* [Internet]. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine; 2013 [cited 2021 Sep 8];23:28–42. Available from: <https://www.biochemia-medica.com/en/journal/23/10.11613/BM.2013.006>
107. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. Proc Natl Acad Sci U S A; 2008 [cited 2021 Jun 14];105:16731–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18936492/>
108. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn’s disease of the colon. *Gut* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2003 [cited 2021 Jun 14];52:237–42. Available from: </pmc/articles/PMC1774977/>
109. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiol* [Internet]. BioMed Central; 2008 [cited 2021 Jun 14];8:232. Available from: </pmc/articles/PMC2635381/>
110. Duranti S, Gaiani F, Mancabelli L, Milani C, Grandi A, Bolchi A, et al. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. Oxford University Press (OUP); 2016 [cited 2021 Jun 14];92:fiw191. Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article/92/12/fiw191/2570427>
111. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn’s disease. *Gastroenterology* [Internet]. W.B. Saunders; 2004 [cited 2021 Jun 14];127:412–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15300573/>
112. Rowan F, Docherty NG, Murphy M, Murphy B, Coffey JC, O’Connell PR. Desulfovibrio Bacterial Species Are Increased in Ulcerative Colitis. *Dis Colon Rectum* [Internet]. Dis Colon Rectum; 2010 [cited 2021 Jun 14];53:1530–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20940602/>
113. Ohkusa T, Yoshida T, Sato N, Watanabe S, Tajiri H, Okayasu I. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *J Med Microbiol* [Internet]. Microbiology Society; 2009 [cited 2021 Sep 9];58:535–45. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.005801-0>
114. T O, N S, T O, K M, M O, I O. Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. J Gastroenterol Hepatol; 2002 [cited 2021 Sep 9];17:849–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12164960/>
115. WS G, GM, Lord, S P, G L-V, SK M, S I, et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* [Internet]. Cell; 2007 [cited 2021 Sep 8];131:33–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17923086/>
116. Zenewicz LA, Yin X, Wang G, Elinav E, Hao L, Zhao L, et al. IL-22 Deficiency Alters Colonic Microbiota To Be Transmissible and Colitogenic. *J Immunol. The American Association of Immunologists*; 2013;190:5306–12.
117. Nitzan O, Elias M, Peretz A, Saliba W. Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc; 2016 [cited 2021 Sep 10];22:1078. Available from: </pmc/articles/PMC4716021/>
118. McNees AL, Markesich D, Zayyani NR, Graham DY. Mycobacterium paratuberculosis as a cause of Crohn’s disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. NIH Public Access; 2015 [cited 2021 Sep 10];9:1523. Available from: </pmc/articles/PMC4894645/>
119. Nitzan O, Elias M, Chazan B, Raz R, Saliba W. Clostridium difficile and inflammatory bowel disease: Role in pathogenesis and implications in treatment. *World J Gastroenterol* [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc; 2013 [cited 2021 Sep 10];19:7577. Available from: </pmc/articles/PMC3837256/>

120. Colman RJ, Rubin DT. Fecal Microbiota Transplantation as Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Crohns Colitis* [Internet]. NIH Public Access; 2014 [cited 2021 Sep 10];8:1569. Available from: [/pmc/articles/PMC4296742/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25857665/)
121. P M, MG S, PT K, J L, M W, C O, et al. Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* [Internet]. *Gastroenterology*; 2015 [cited 2021 Sep 10];149:102-109.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25857665/>
122. Lopetuso LR, Ianaro G, Allegretti JR, Bibbò S, Gasbarrini A, Scaldaferri F, et al. Fecal transplantation for ulcerative colitis: current evidence and future applications. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. *Expert Opin Biol Ther*; 2020 [cited 2022 Jan 17];20:343–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32083498/>
123. D I, T S, M T, K K-A, K H, S I, et al. The Microbial Composition of Bacteroidetes Species in Ulcerative Colitis Is Effectively Improved by Combination Therapy With Fecal Microbiota Transplantation and Antibiotics. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. *Inflamm Bowel Dis*; 2018 [cited 2021 Sep 10];24:2590–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30124831/>
124. Okahara K, Ishikawa D, Nomura K, Ito S, Haga K, Takahashi M, et al. Matching between Donors and Ulcerative Colitis Patients Is Important for Long-Term Maintenance after Fecal Microbiota Transplantation. *J Clin Med* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020 [cited 2021 Sep 10];9:1650. Available from: [/pmc/articles/PMC7355579/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30124831/)
125. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D V, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 2012 139 [Internet]. *BioMed Central*; 2012 [cited 2021 Sep 9];13:1–18. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2012-13-9-r79>
126. R T, I S, H R, M B, A B, C T-B. Probiotic bacteria lactobacillus and bifidobacterium attenuate inflammation in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* [Internet]. *Int J Immunopathol Pharmacol*; 2014 [cited 2021 Sep 22];27:615–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25572742/>
127. NS NK, R B, K J, A P, S P, BS R. Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulfate. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. *J Gastroenterol Hepatol*; 2008 [cited 2021 Sep 22];23:1834–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19120873/>
128. MC S, FC Z, X Y, BJ C, CH Z, YL W, et al. Lactobacillus reuteri F-9-35 Prevents DSS-Induced Colitis by Inhibiting Proinflammatory Gene Expression and Restoring the Gut Microbiota in Mice. *J Food Sci* [Internet]. *J Food Sci*; 2018 [cited 2021 Sep 22];83:2645–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30216448/>
129. Kim W-K, Han DH, Jang YJ, Park S, Jang SJ, Lee G, et al. Alleviation of DSS-induced colitis via Lactobacillus acidophilus treatment in mice. *Food Funct* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2021 [cited 2021 Sep 22];12:340–50. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/fo/d0fo01724h>
130. Wang F, Yin Q, Chen L, Davis MM. Bifidobacterium can mitigate intestinal immunopathology in the context of CTLA-4 blockade. [cited 2021 Sep 22]; Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1712901115](https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/fo/d0fo01724h)
131. Srutkova D, Schwarzer M, Hudcovic T, Zakostelska Z, Drab V, Spanova A, et al. Bifidobacterium longum CCM 7952 Promotes Epithelial Barrier Function and Prevents Acute DSS-Induced Colitis in Strictly Strain-Specific Manner. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2015 [cited 2021 Sep 22];10:e0134050. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134050>
132. Izumi H, Minegishi M, Sato Y, Shimizu T, Sekine K, Takase M. Bifidobacterium breve alters immune function and ameliorates DSS-induced inflammation in weanling rats. *Pediatr Res* 2015 784 [Internet]. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2021 Sep 22];78:407–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/pr2015115>
133. Zhou L, Zhang M, Wang Y, Dorfman RG, Liu H, Yu T, et al. Faecalibacterium prausnitzii Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1. *Inflamm*



Bowel Dis. Oxford Academic; 2018;24:1926–40.

134. Martín R, Miquel S, Benevides L, Bridonneau C, Robert V, Hudault S, et al. Functional characterization of novel *Faecalibacterium prausnitzii* strains isolated from healthy volunteers: A step forward in the use of *F. prausnitzii* as a next-generation probiotic. *Front Microbiol* [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2017 [cited 2021 Feb 26];8:1226. Available from: [/pmc/articles/PMC5492426/](https://pmc/articles/PMC5492426/)

135. Martín R, Chain F, Miquel S, Lu J, Gratadoux J-J, Sokol H, et al. The Commensal Bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* Is Protective in DNBS-induced Chronic Moderate and Severe Colitis Models. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. Narnia; 2014 [cited 2019 Oct 4];20:417–30. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/20/3/417-430/4578963>

136. Miquel S, Leclerc M, Martin R, Chain F, Lenoir M, Raguideau S, et al. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *MBio* [Internet]. American Society for Microbiology; 2015 [cited 2021 Feb 26];6:1–10. Available from: <http://mbio.asm.org/>

137. Martins Breyner N, Michon C, De Sousa CS, Bagano PC, Boas V, Chain F, et al. Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* Shows a Protective Effect on DNBS and DSS-Induced Colitis Model in Mice through Inhibition of NF-kappa B Pathway. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Feb 26];8. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01604976>

138. Segain J-P, Blétière DR de la, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2000 [cited 2021 Sep 22];47:397–403. Available from: <https://gut.bmj.com/content/47/3/397>

139. K S, AM P. Review of *Saccharomyces boulardii* as a treatment option in IBD. *Immunopharmacol Immunotoxicol* [Internet]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; 2018 [cited 2021 Sep 22];40:465–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29771163/>

140. A B, S G, RN B, C B, J E, GD F, et al. A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus GG* versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. *Inflamm Bowel Dis*; 2005 [cited 2021 Sep 22];11:833–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16116318/>

141. Y D, DJ G, PJ H, AC F. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. *Aliment Pharmacol Ther*; 2017 [cited 2021 Sep 22];46:389–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28653751/>

142. Scaldaferri F, Gerardi V, Mangiola F, Lopetuso LR, Pizzoferrato M, Petito V, et al. Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: An update. <http://www.wjgnet.com/> [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc.; 2016 [cited 2021 Sep 22];22:5505–11. Available from: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i24/5505.htm>

143. Guandalini S, Sansotta N. Probiotics in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. Springer, Cham; 2019 [cited 2021 Sep 22];1125:101–7. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-9319-1\\_319](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-9319-1_319)

144. Kim H, Jeong Y, Kang S, You HJ, Ji GE. Co-culture with *Bifidobacterium catenulatum* improves the growth, gut colonization, and butyrate production of *Faecalibacterium prausnitzii*: In vitro and in vivo studies. *Microorganisms* [Internet]. MDPI AG; 2020 [cited 2021 Feb 26];8. Available from: [/pmc/articles/PMC7285360/](https://pmc/articles/PMC7285360/)

145. Bhan AK, Mizoguthi E, Smith RN, Mizoguchi A. Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1999 [cited 2021 Sep 21];169:195–207. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01316.x>

146. JN W, J B, JL V. The *mdr1a*<sup>-/-</sup> mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease. *Immunol Res* [Internet]. *Immunol Res*; 2005 [cited 2021 Sep 21];31:151–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15778512/>

147. Mizoguchi E, Low D, Ezaki Y, Okada T. Recent updates on the basic mechanisms and pathogenesis of inflammatory bowel diseases in experimental animal models. *Intest Res* [Internet]. Korean Association for the Study of Intestinal Diseases; 2020 [cited 2021 Sep 21];18:151. Available from: [/pmc/articles/PMC7206339/](#)
148. Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, et al. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *J Clin Invest* [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2001 [cited 2021 Sep 24];107:695. Available from: [/pmc/articles/PMC208944/](#)
149. JP S, CO E, H B, EH B. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* [Internet]. *Gastroenterology*; 1994 [cited 2021 Sep 21];107:1726–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7958684/>
150. Eri R, McGuckin MA, Wadley R. T Cell Transfer Model of Colitis: A Great Tool to Assess the Contribution of T Cells in Chronic Intestinal Inflammation. *Methods Mol Biol* [Internet]. Humana Press; 2012 [cited 2021 Sep 22];844:261–75. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-527-5\\_19](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-527-5_19)
151. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007 23 [Internet]. Nature Publishing Group; 2007 [cited 2021 Sep 22];2:541–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.41>
152. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen T-E, Conklin LS, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. NIH Public Access; 2009 [cited 2018 Dec 10];15:341–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942757>
153. Etude ESTEBAN 2014-2016 – Chapitre corpulence : stabilisation du surpoids et de l'obésité chez l'enfant et l'adulte [Internet]. [cited 2021 Sep 24]. Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2017/etude-esteban-2014-2016-chapitre-corpulence-stabilisation-du-surpoids-et-de-l-obesite-chez-l-enfant-et-l-adulte>
154. KR F, DT R, C W, AO W, DB A. Years of life lost due to obesity. *JAMA* [Internet]. *JAMA*; 2003 [cited 2021 Sep 29];289:187–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12517229/>
155. Breuhl Smith K, Seth Smith M. Obesity Statistics. 2016 [cited 2021 Sep 28]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2015.10.001>
156. Pearson-Stuttard J, Zhou B, Kontis V, Bentham J, Gunter MJ, Ezzati M. Worldwide burden of cancer attributable to diabetes and high body-mass index: a comparative risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2021 Sep 27];6:e6. Available from: [/pmc/articles/PMC5982644/](#)
157. LJ E, R L, JP S, JR W, JS L, S C, et al. Obesity and disability - a short review. *Obes Rev* [Internet]. *Obes Rev*; 2006 [cited 2021 Sep 29];7:341–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17038128/>
158. The Heavy Burden of Obesity THE ECONOMICS OF PREVENTION [Internet]. 2019. Available from: <https://doi.org/10.1787/67450d67-en>.
159. Santé Publique France. ÉVOLUTION DES MESSAGES SANITAIRES ET PRÉCONISATIONS CONCERNANT L'ENCADREMENT DU MARKETING DES PRODUITS GRAS, SUCRÉS, SALÉS. 2020;
160. Ramachandran D, Kite J, Vassallo AJ, Chau JY, Partridge S, Freeman B, et al. Food Trends and Popular Nutrition Advice Online – Implications for Public Health. *Online J Public Health Inform* [Internet]. University of Illinois at Chicago Library; 2018 [cited 2021 Sep 29];10:213. Available from: [/pmc/articles/PMC6194095/](#)
161. Position of the American Dietetic Association: Food and Nutrition Misinformation. *J Am Diet Assoc*. Elsevier; 2006;106:601–7.
162. Dietz WH. Double-duty solutions for the double burden of malnutrition. *Lancet*. Elsevier; 2017;390:2607–8.
163. Sellayah D, Cagampang FR, Cox RD. On the Evolutionary Origins of Obesity: A New Hypothesis. *Endocrinology* [Internet]. Oxford Academic; 2014 [cited 2021 Sep 29];155:1573–88. Available from:

<https://academic.oup.com/endo/article/155/5/1573/2423015>

164. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2019 155 [Internet]. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2021 Sep 29];15:288–98. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41574-019-0176-8>
165. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The Body-Mass Index of Twins Who Have Been Reared Apart. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199005243222102> [Internet]. Massachusetts Medical Society ; 2010 [cited 2021 Sep 29];322:1483–7. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199005243222102>
166. AJ S, TI S, C H, TW T, R C, WJ S, et al. An adoption study of human obesity. *N Engl J Med* [Internet]. *N Engl J Med*; 1986 [cited 2021 Sep 29];314:193–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3941707/>
167. TI S, C H, AJ S. Adoption study of environmental modifications of the genetic influences on obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* [Internet]. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 1998 [cited 2021 Sep 29];22:73–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9481603/>
168. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nat* 1997 3876636 [Internet]. Nature Publishing Group; 1997 [cited 2021 Sep 29];387:903–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/43185>
169. Funcke J-B, Schnurbein J von, Lennerz B, Lahr G, Debatin K-M, Fischer-Posovszky P, et al. Monogenic forms of childhood obesity due to mutations in the leptin gene. *Mol Cell Pediatr* [Internet]. Springer; 2014 [cited 2021 Sep 29];1. Available from: </pmc/articles/PMC4644131/>
170. Loos RJF, Janssens ACJW. Predicting Polygenic Obesity Using Genetic Information. *Cell Metab*. Cell Press; 2017;25:535–43.
171. Block JP, He Y, Zaslavsky AM, Ding L, Ayanian JZ. Psychosocial Stress and Change in Weight Among US Adults. *Am J Epidemiol* [Internet]. Oxford University Press; 2009 [cited 2021 Sep 29];170:181. Available from: </pmc/articles/PMC2727271/>
172. Jackson SE, Beeken RJ, Wardle J. Perceived weight discrimination and changes in weight, waist circumference, and weight status. *Obesity (Silver Spring)* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2014 [cited 2021 Sep 29];22:2485. Available from: </pmc/articles/PMC4236245/>
173. Simon GE, Ludman EJ, Linde JA, Operskalski BH, Ichikawa L, Rohde P, et al. ASSOCIATION BETWEEN OBESITY AND DEPRESSION IN MIDDLE-AGED WOMEN. *Gen Hosp Psychiatry* [Internet]. NIH Public Access; 2008 [cited 2021 Sep 29];30:32. Available from: </pmc/articles/PMC2675189/>
174. Tseng E, Zhang A, Shogbesan O, Gudzone KA, Wilson RF, Kharrazi H, et al. Effectiveness of Policies and Programs to Combat Adult Obesity: a Systematic Review. *J Gen Intern Med* 2018 3311 [Internet]. Springer; 2018 [cited 2021 Sep 29];33:1990–2001. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11606-018-4619-z>
175. Ryan DH, Yockey SR. Weight Loss and Improvement in Comorbidity: Differences at 5%, 10%, 15%, and Over. *Curr Obes Rep* [Internet]. NIH Public Access; 2017 [cited 2021 Sep 30];6:187. Available from: </pmc/articles/PMC5497590/>
176. GD F, TA W, RA V, G B. What is a reasonable weight loss? Patients' expectations and evaluations of obesity treatment outcomes. *J Consult Clin Psychol* [Internet]. *J Consult Clin Psychol*; 1997 [cited 2021 Sep 30];65:79–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9103737/>
177. Hall KD, Kahan S. Maintenance of lost weight and long-term management of obesity. *Med Clin North Am* [Internet]. NIH Public Access; 2018 [cited 2021 Sep 28];102:183. Available from: </pmc/articles/PMC5764193/>
178. Rosenbaum M, Leibel RL. Adaptive thermogenesis in humans. *Int J Obes (Lond)* [Internet]. NIH Public Access; 2010 [cited 2021 Nov 19];34:S47. Available from: </pmc/articles/PMC3673773/>

179. Tremblay A, Royer MM, Chaput JP, Doucet É. Adaptive thermogenesis can make a difference in the ability of obese individuals to lose body weight. *Int J Obes* 2013 376 [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2021 Nov 19];37:759–64. Available from: <https://www.nature.com/articles/ijo2012124>
180. Pinto RM, Cominetti C, Divino Da Cruz A. Basic and Genetic Aspects of Food Intake Control and Obesity: Role of Dopamin Receptor D2 TaqIA Polymorphism. undefined [Internet]. Openventio Publishers; 2016 [cited 2021 Nov 18];2:119–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.17140/OROJ-2-119>
181. Guyenet SJ, Schwartz MW. Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Body Fat Mass: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. Oxford Academic; 2012 [cited 2021 Nov 18];97:745–55. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/97/3/745/2536298>
182. Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* [Internet]. Science; 1995 [cited 2021 Nov 19];269:540–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7624776/>
183. Yadav VK, Oury F, Tanaka K, Thomas T, Wang Y, Cremers S, et al. Leptin-dependent serotonin control of appetite: temporal specificity, transcriptional regulation, and therapeutic implications. *J Exp Med* [Internet]. The Rockefeller University Press; 2011 [cited 2021 Nov 19];208:41. Available from: </pmc/articles/PMC3023132/>
184. Considine R V., Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* [Internet]. N Engl J Med; 1996 [cited 2021 Nov 18];334:292–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8532024/>
185. Morton GJ, Schwartz MW. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* [Internet]. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 2001 [cited 2021 Nov 18];25 Suppl 5:S56–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11840217/>
186. Münzberg H, Flier JS, Bjørnbæk C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* [Internet]. *Endocrinology*; 2004 [cited 2021 Nov 19];145:4880–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15271881/>
187. Ahima RS. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. *J Clin Invest* [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2008 [cited 2021 Nov 19];118:2380. Available from: </pmc/articles/PMC2430504/>
188. Harris RBS, Zhou J, Redmann SM, Smagin GN, Smith SR, Rodgers E, et al. A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. *Endocrinology* [Internet]. *Endocrinology*; 1998 [cited 2021 Nov 19];139:8–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9421392/>
189. Kaiyala KJ, Ogimoto K, Nelson JT, Schwartz MW, Morton GJ. Leptin Signaling Is Required for Adaptive Changes in Food Intake, but Not Energy Expenditure, in Response to Different Thermal Conditions. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2015 [cited 2021 Nov 19];10:e0119391. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119391>
190. Singh A, Wirtz M, Parker N, Hogan M, Strahler J, Michailidis G, et al. Leptin-mediated changes in hepatic mitochondrial metabolism, structure, and protein levels. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. National Academy of Sciences; 2009 [cited 2021 Nov 19];106:13100–5. Available from: <https://www.pnas.org/content/106/31/13100>
191. Tak YJ, Lee SY. Long-Term Efficacy and Safety of Anti-Obesity Treatment: Where Do We Stand? *Curr Obes Reports* 2021 101 [Internet]. Springer; 2021 [cited 2021 Sep 30];10:14–30. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13679-020-00422-w>
192. Moreira APB, Texeira TFS, Ferreira AB, Peluzio M do CG, Alfenas R de CG. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr* [Internet]. Cambridge University Press; 2012 [cited 2021 Sep 27];108:801–9. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/influence-of-a-highfat-diet-on-gut-microbiota-intestinal-permeability-and-metabolic-endotoxaemia/C4AEB961BE12DF26457DB807D98D2BDD>

193. Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. Elsevier; 2015 [cited 2019 Apr 19];3:207–15. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213858714701342?via%3Dihub>
194. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* [Internet]. Oxford Academic; 2008 [cited 2021 Sep 20];87:1219–23. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/87/5/1219/4754449>
195. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2021 Sep 30];182:375–87. Available from: <http://ajp.amjpathol.org/article/S0002944012008085/fulltext>
196. J C, L J, L P. Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* [Internet]. Obes Rev; 2013 [cited 2021 Sep 30];14:232–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23171381/>
197. Benninghoff AD, Hintze KJ, Monsanto SP, Rodriguez DM, Hunter AH, Phatak S, et al. Consumption of the Total Western Diet Promotes Colitis and Inflammation-Associated Colorectal Cancer in Mice. *Nutrients* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020 [cited 2021 Oct 28];12. Available from: </pmc/articles/PMC7071445/>
198. HL N, K Y, M L, L K, Y L, K F, et al. A Western-style diet induces benign and malignant neoplasms in the colon of normal C57Bl/6 mice. *Carcinogenesis* [Internet]. Carcinogenesis; 2001 [cited 2021 Oct 28];22:1871–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11698351/>
199. HL N, M L, N M. Colonic hyperplasia and hyperproliferation induced by a nutritional stress diet with four components of Western-style diet. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. J Natl Cancer Inst; 1990 [cited 2021 Oct 28];82:491–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2313721/>
200. Li X, Wei X, Sun Y, Du J, Li X, Xun Z, et al. High-fat diet promotes experimental colitis by inducing oxidative stress in the colon. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00103.2019> [Internet]. American Physiological Society Bethesda, MD ; 2019 [cited 2021 Oct 28];317:G453–62. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpgi.00103.2019>
201. Teixeira LG, Leonel AJ, Aguilar EC, Batista N V, Alves AC, Coimbra CC, et al. The combination of high-fat diet-induced obesity and chronic ulcerative colitis reciprocally exacerbates adipose tissue and colon inflammation. *Lipids Heal Dis* 2011 101 [Internet]. BioMed Central; 2011 [cited 2021 Oct 28];10:1–15. Available from: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-10-204>
202. Xie R, Sun Y, Wu J, Huang S, Jin G, Guo Z, et al. Maternal High Fat Diet Alters Gut Microbiota of Offspring and Exacerbates DSS-Induced Colitis in Adulthood. *Front Immunol*. Frontiers; 2018;0:2608.
203. Raetzsch CF, Brooks NL, Alderman JMK, Moore KS, Hosick PA, Klebanov S, et al. Lipopolysaccharide inhibition of glucose production through the Toll-like receptor-4, myeloid differentiation factor 88, and nuclear factor kb pathway. *Hepatology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2009 [cited 2021 Nov 19];50:592–600. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.22999>
204. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761–72.
205. Van Der Crabben SN, Blümer RME, Stegenga ME, Ackermans MT, Endert E, Tanck MWT, et al. Early endotoxemia increases peripheral and hepatic insulin sensitivity in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. J Clin Endocrinol Metab; 2009 [cited 2021 Nov 19];94:463–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18984669/>
206. Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NMJ, Magness S, et al. High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse.

- PLoS One [Internet]. Public Library of Science; 2010 [cited 2021 Sep 20];5:e12191. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012191>
207. Pendyala S, Neff LM, Suárez-Fariñas M, Holt PR. Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. *Am J Clin Nutr* [Internet]. Oxford Academic; 2011 [cited 2021 Sep 20];93:234–42. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/93/2/234/4597599>
208. RB S, X Y, MG L, JF Y, JD F, S K, et al. Multiple inflammatory biomarkers in relation to cardiovascular events and mortality in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. Arterioscler Thromb Vasc Biol; 2013 [cited 2021 Sep 20];33:1728–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23640499/>
209. Collaboration TERF. C-Reactive Protein, Fibrinogen, and Cardiovascular Disease Prediction. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1107477> [Internet]. Massachusetts Medical Society ; 2012 [cited 2021 Sep 20];367:1310–20. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1107477>
210. AG B, GL B, JA O, MR C, D V, RG B, et al. Inflammation and the incidence of type 2 diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care* [Internet]. Diabetes Care; 2010 [cited 2021 Sep 20];33:804–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20097779/>
211. J S, A K, M M, K H, MM B, M R, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* [Internet]. Diabetes; 2003 [cited 2021 Sep 20];52:812–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12606524/>
212. BS W, C L, A M, E B-K. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Lab Anim Sci* [Internet]. 1983 [cited 2021 Oct 1];33:46–50. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/6834773>
213. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:15718–23.
214. Hooper L V., Midtvedt T, Gordon JI. HOW HOST-MICROBIAL INTERACTIONS SHAPE THE NUTRIENT ENVIRONMENT OF THE MAMMALIAN INTESTINE. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259> [Internet]. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA ; 2003 [cited 2021 Oct 1];22:283–307. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259>
215. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. Nature Publishing Group; 2006;444:1027–31.
216. Kim KN, Yao Y, Ju SY. Short Chain Fatty Acids and Fecal Microbiota Abundance in Humans with Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2019 [cited 2021 Nov 18];11. Available from: [/pmc/articles/PMC6835694/](https://pmc/articles/PMC6835694/)
217. Riley LW, Raphael E, Faerstein E. Obesity in the United States – Dysbiosis from Exposure to Low-Dose Antibiotics? *Front Public Heal* [Internet]. Frontiers Media SA; 2013 [cited 2021 Nov 18];1. Available from: [/pmc/articles/PMC3867737/](https://pmc/articles/PMC3867737/)
218. Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. Elsevier; 2013;54:2325–40.
219. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O’Connell TM, Bunger MK, et al. The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metab* [Internet]. NIH Public Access; 2011 [cited 2021 Nov 21];13:517. Available from: [/pmc/articles/PMC3099420/](https://pmc/articles/PMC3099420/)
220. He J, Zhang P, Shen L, Niu L, Tan Y, Chen L, et al. Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci* [Internet]. Multidisciplinary Digital

Publishing Institute (MDPI); 2020 [cited 2021 Nov 19];21:1–16. Available from: [/pmc/articles/PMC7503625/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22506074/)

221. Lin H V., Frassetto A, Kowalik EJ, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One* [Internet]. *PLoS One*; 2012 [cited 2022 Jan 17];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22506074/>

222. A B, KO V, T M, K N. Intestinal and gastric bypass. Changes in intestinal microecology after surgical treatment of morbid obesity in man. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. *Scand J Gastroenterol*; 1981 [cited 2021 Sep 27];16:681–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7323701/>

223. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. National Academy of Sciences; 2005 [cited 2021 Oct 1];102:11070–5. Available from: <https://www.pnas.org/content/102/31/11070>

224. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill–Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen Y, et al. High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier; 2009 [cited 2021 Oct 1];137:1716-1724.e2. Available from: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508509014577/fulltext>

225. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 2010 [cited 2019 Jun 5];107:14691–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20679230>

226. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020 [cited 2021 Oct 28];12. Available from: [/pmc/articles/PMC7285218/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22122897/)

227. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [cited 2021 Oct 1];19:29–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.13589>

228. MM S, MM A, AE S-E, AA A-A. Butyrate regulates leptin expression through different signaling pathways in adipocytes. *J Vet Sci* [Internet]. *J Vet Sci*; 2011 [cited 2021 Oct 1];12:319–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22122897/>

229. Z G, J Y, J Z, RE W, RJ M, M L, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* [Internet]. *Diabetes*; 2009 [cited 2021 Oct 1];58:1509–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19366864/>

230. L B, K VH, I K, C VN, N H, C V, et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathog* [Internet]. *Gut Pathog*; 2013 [cited 2021 Oct 1];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23631345/>

231. Balamurugan R, George G, Kabeerdoss J, Hepsiba J, Chandragunasekaran AMS, Ramakrishna BS. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *Br J Nutr* [Internet]. Cambridge University Press; 2010 [cited 2021 Feb 18];103:335–8. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0007114509992182>

232. M R, B H, J Z, E A, H B, AG H. Gut Microbiota of Obese, Type 2 Diabetic Individuals is Enriched in *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* and *Peptostreptococcus anaerobius* after Weight Loss. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* [Internet]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*; 2016 [cited 2021 Oct 1];16:99–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27577947/>

233. Zhou Q, Pang G, Zhang Z, Yuan H, Chen C, Zhang N, et al. Association Between Gut *Akkermansia* and Metabolic Syndrome is Dose-Dependent and Affected by Microbial Interactions: A Cross-Sectional Study. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* [Internet]. Dove Press; 2021 [cited 2021 Oct 29];14:2177. Available

from: /pmc/articles/PMC8139944/

234. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*. 2008;57:1470–81.
235. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb11142> [Internet]. Future Medicine Ltd London, UK ; 2011 [cited 2021 Sep 27];7:91–109. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.11.142>
236. PD C, AM N, F F, C K, RG B, KM T, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* [Internet]. *Diabetologia*; 2007 [cited 2021 Sep 27];50:2374–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17823788/>
237. Bergmann KR, Liu SXL, Tian R, Kushnir A, Turner JR, Li H-L, et al. Bifidobacteria Stabilize Claudins at Tight Junctions and Prevent Intestinal Barrier Dysfunction in Mouse Necrotizing Enterocolitis. *Am J Pathol* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2013 [cited 2021 Sep 27];182:1595. Available from: /pmc/articles/PMC3644725/
238. M C, G DL, JB G, HE R, DA M. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 2012 [cited 2021 Sep 27];55:321–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22383026/>
239. R M, L L, F C, S M, J N, C C, et al. Bifidobacterium animalis ssp. lactis CNCM-I2494 Restores Gut Barrier Permeability in Chronically Low-Grade Inflamed Mice. *Front Microbiol* [Internet]. *Front Microbiol*; 2016 [cited 2021 Sep 27];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27199937/>
240. Mazloom K, Siddiqi I, Covasa M. Probiotics: How Effective Are They in the Fight against Obesity? *Nutrients* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2019 [cited 2022 Jan 17];11. Available from: /pmc/articles/PMC6412733/
241. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 2013 [cited 2021 Oct 29];110:9066. Available from: /pmc/articles/PMC3670398/
242. Chelakkot C, Choi Y, Kim D-K, Park HT, Ghim J, Kwon Y, et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Exp Mol Med* 2018 502 [Internet]. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 Oct 29];50:e450–e450. Available from: <https://www.nature.com/articles/emm2017282>
243. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 2016 231 [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2021 Oct 29];23:107–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.4236>
244. Parekh PJ, Balart LA, Johnson DA. The Influence of the Gut Microbiome on Obesity, Metabolic Syndrome and Gastrointestinal Disease. *Clin Transl Gastroenterol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2018 Oct 18];6:e91–e91. Available from: <http://www.nature.com/articles/ctg201516>
245. Eiseman B, Silen W, BASCOM GS, KAUVAR AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* [Internet]. 1958 [cited 2022 Jan 17]; Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=35777873-5528-4788-84d4-5c9cd00c9ab7>
246. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. Nature Publishing Group; 2018;14:140–62.



247. Lutz TA, Woods SC. Overview of Animal Models of Obesity. *Curr Protoc Pharmacol* [Internet]. NIH Public Access; 2012 [cited 2021 Sep 16];CHAPTER:Unit5.61. Available from: [/pmc/articles/PMC3482633/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24242633/)
248. Pandit R, Mercer JG, Overduin J, Fleur SE la, Adan RAH. Dietary Factors Affect Food Reward and Motivation to Eat. *Obes Facts* [Internet]. Karger Publishers; 2012 [cited 2021 Sep 16];5:221–42. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/338073>
249. Reyes TM. High-fat diet alters the dopamine and opioid systems: effects across development. *Int J Obes Suppl* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2021 Sep 16];2:S25. Available from: [/pmc/articles/PMC4850606/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24242606/)
250. Odermatt A. The Western-style diet: a major risk factor for impaired kidney function and chronic kidney disease. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00068.2011> [Internet]. American Physiological Society Bethesda, MD; 2011 [cited 2021 Sep 16];301:919–31. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajprenal.00068.2011>
251. MR F, J K, E K. Popular diets: a scientific review. *Obes Res* [Internet]. *Obes Res*; 2001 [cited 2021 Sep 16];9 Suppl 1:1S–5S. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11374180/>
252. Speakman JR. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int J Obes* [Internet]. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2019 Oct 2];43:1491–2. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41366-019-0363-7>
253. Lai M, Chandrasekera PC, Barnard ND. You are what you eat, or are you? The challenges of translating high-fat-fed rodents to human obesity and diabetes. *Nutr Diabetes* 2014 49 [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2021 Sep 16];4:e135–e135. Available from: <https://www.nature.com/articles/nutd201430>
254. E R-R, BJ S. Methodological considerations when studying the skeletal response to glucose intolerance using the diet-induced obesity model. *Bonekey Rep* [Internet]. *Bonekey Rep*; 2016 [cited 2021 Sep 16];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27818742/>
255. Laugerette F, Furet J-P, Debarb C, Daira P, Loizon E, Gélouën A, et al. Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00314.2011> [Internet]. American Physiological Society Bethesda, MD; 2012 [cited 2021 Sep 16];302:374–86. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpendo.00314.2011>
256. AW T, YM G, MA R, M M, M E. A high-fat diet enriched with low omega-6 to omega-3 fatty acid ratio reduced fat cellularity and plasma leptin concentration in Sprague-Dawley rats. *ScientificWorldJournal* [Internet]. *ScientificWorldJournal*; 2013 [cited 2021 Sep 16];2013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24294136/>
257. Yan S, Zhou H, Liu S, Wang J, Zeng Y, Matias FB, et al. Differential effects of Chinese high-fat dietary habits on lipid metabolism: mechanisms and health implications. *Lipids Heal Dis* 2020 191 [Internet]. *BioMed Central*; 2020 [cited 2021 Sep 16];19:1–9. Available from: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-020-01212-y>
258. Kubant R, Poon AN, Sánchez-Hernández D, Domenichiello AF, Huot PSP, Pannia E, et al. A comparison of effects of lard and hydrogenated vegetable shortening on the development of high-fat diet-induced obesity in rats. *Nutr Diabetes* 2015 512 [Internet]. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2021 Sep 16];5:e188–e188. Available from: <https://www.nature.com/articles/nutd201540>
259. Lang P, Hasselwander S, Li H, Xia N. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Sci Reports* 2019 91 [Internet]. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2021 Sep 16];9:1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-55987-x>
260. Weersma RK, Zhernakova A, Fu J. Interaction between drugs and the gut microbiome. *Gut* [Internet]. *BMJ Publishing Group*; 2020 [cited 2022 Jan 18];69:1510–9. Available from: <https://gut.bmj.com/content/69/8/1510>

261. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields [Internet]. *Front. Microbiol. Frontiers Media S.A.*; 2020 [cited 2021 Jun 16]. p. 582779. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
262. De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2005 [cited 2021 Jun 22];1337–47. Available from: <http://www.bbcm.com>.
263. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2005 [cited 2021 Jun 22];102:18129–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16330776/>
264. Williams AD, Korolkova OY, Sakwe AM, Geiger TM, James SD, Muldoon RL, et al. Human alpha defensin 5 is a candidate biomarker to delineate inflammatory bowel disease. *PLoS One* [Internet]. *Public Library of Science*; 2017 [cited 2021 Jun 22];12. Available from: [/pmc/articles/PMC5560519/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/300560519/)
265. Giesemann T, Guttenberg G, Aktories K. Human  $\alpha$ -Defensins Inhibit Clostridium difficile Toxin B. *Gastroenterology* [Internet]. *W.B. Saunders*; 2008 [cited 2021 Jun 22];134:2049–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18435932/>
266. Kim C, Gajendran N, Mittrücker HW, Weiwad M, Song YH, Hurwitz R, et al. Human  $\alpha$ -defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. *National Academy of Sciences*; 2005 [cited 2021 Jun 22];102:4830–5. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073pnas.0500508102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1073pnas.0500508102)
267. Kim C, Slavinskaya Z, Merrill AR, Kaufmann SHE. Human  $\alpha$ -defensins neutralize toxins of the mono-ADP-ribosyltransferase family. *Biochem J* [Internet]. *Portland Press Ltd*; 2006 [cited 2021 Jun 22];399:225–9. Available from: [/pmc/articles/PMC1609915/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1609915/)
268. Jonard L, Banh L, Pressac M, Just J, Bahuau M. Les défensines en physiopathologie humaine. *Immuno-Analyse Biol. Spec. Elsevier Masson*; 2006. p. 342–7.
269. Hajishengallis G, Russell MW. *Innate Humoral Defense Factors. Mucosal Immunol Fourth Ed.* Elsevier Inc.; 2015. p. 261–261.
270. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol* [Internet]. *Academic Press*; 2012 [cited 2018 Dec 12];280:22–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874912002031?via%3Dihub>
271. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* [Internet]. *Trends Immunol*; 2009 [cited 2021 Nov 15];30:131–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19217824/>
272. Narushima Y, Unno M, Nakagawara KI, Mori M, Miyashita H, Suzuki Y, et al. Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III Reg, RegIII alpha, RegIII beta, RegIII gamma. *Gene* [Internet]. *Gene*; 1997 [cited 2021 Nov 22];185:159–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9055810/>
273. Lehotzkya RE, Partchb CL, Mukherjee S, Casha HL, Goldman WE, Gardner KH, et al. Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. *National Academy of Sciences*; 2010 [cited 2021 Nov 22];107:7722–7. Available from: <https://www.pnas.org/content/107/17/7722>
274. Ménard S, Förster V, Lotz M, Gütle D, Duerr CU, Gallo RL, et al. Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *J Exp Med* [Internet]. *The Rockefeller University Press*; 2008 [cited 2021 Nov 16];205:183. Available from: [/pmc/articles/PMC2234368/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2234368/)
275. Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Sandra Tjabringa G, Hiemstra PS, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood. Content Repository Only*; 2001;97:3951–9.

276. Kolls JK, McCray PB, Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* [Internet]. NIH Public Access; 2008 [cited 2021 Nov 15];8:829. Available from: [/pmc/articles/PMC2901862/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15322146/)
277. Liu JZ, Pezeshki M, Raffatellu M. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: Dichotomies of help and harm. *Cytokine*. Academic Press; 2009;48:156–60.
278. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2008 [cited 2019 Jan 4];14:282–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1720>
279. Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* [Internet]. J Immunol; 2004 [cited 2021 Nov 17];173:2909–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15322146/>
280. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J* [Internet]. FASEB J; 2005 [cited 2021 Nov 17];19:1067–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15985530/>
281. Weber G, Heilborn JD, Jimenez CIC, Hammarsjö A, Törmä H, Ståhle M. Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. *J Invest Dermatol* [Internet]. J Invest Dermatol; 2005 [cited 2021 Nov 17];124:1080–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15854055/>
282. Kida Y, Shimizu T, Kuwano K. Sodium butyrate up-regulates cathelicidin gene expression via activator protein-1 and histone acetylation at the promoter region in a human lung epithelial cell line, EBC-1. *Mol Immunol* [Internet]. Mol Immunol; 2006 [cited 2021 Nov 17];43:1972–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16423398/>
283. Schaubert J, Iffland K, Frisch S, Kudlich T, Schmausser B, Eck M, et al. Histone-deacetylase inhibitors induce the cathelicidin LL-37 in gastrointestinal cells. *Mol Immunol* [Internet]. Mol Immunol; 2004 [cited 2021 Nov 17];41:847–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15261456/>
284. Raftery T, Martineau AR, Greiller CL, Ghosh S, McNamara D, Bennett K, et al. Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study. *United Eur Gastroenterol J* [Internet]. SAGE PublicationsSage UK: London, England; 2015 [cited 2021 Nov 17];3:294–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26137304>
285. Aberg KM, Radek KA, Choi EH, Kim DK, Demerjian M, Hupe M, et al. Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J Clin Invest* [Internet]. J Clin Invest; 2007 [cited 2021 Nov 17];117:3339–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975669/>
286. Suzuki K, Nakamura K, Shimizu Y, Yokoi Y, Ohira S, Hagiwara M, et al. Decrease of  $\alpha$ -defensin impairs intestinal metabolite homeostasis via dysbiosis in mouse chronic social defeat stress model. *Sci Reports* 2021 111 [Internet]. Nature Publishing Group; 2021 [cited 2021 Nov 17];11:1–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89308-y>
287. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 1998 [cited 2021 Nov 17];95:9541. Available from: [/pmc/articles/PMC21374/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15322146/)
288. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Okuda D, Nagaoka I, Ikeda S, et al. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Dermatol Sci* [Internet]. J Dermatol Sci; 2005 [cited 2021 Nov 17];40:123–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15963694/>
289. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-

- defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* [Internet]. *Nat Immunol*; 2000 [cited 2021 Nov 23];1:113–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11248802/>
290. Dupont A, Heinbockel L, Brandenburg K, Hornef MW. Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa. *Gut Microbes* [Internet]. Taylor & Francis; 2014 [cited 2021 Nov 5];5:761. Available from: </pmc/articles/PMC4615892/>
291. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, et al. The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* (80- ) [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2011 [cited 2021 Nov 8];334:255–8. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1209791>
292. Zong X, Fu J, Xu B, Wang Y, Jin M. Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Anim Nutr*. Elsevier; 2020;6:389–96.
293. J S, D R, F W, J W, M E, K F, et al. Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 2006 [cited 2021 Nov 5];18:615–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16702850/>
294. Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* [Internet]. *Am J Hum Genet*; 2002 [cited 2021 Dec 3];70:845–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11875755/>
295. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Herrmann K, et al. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. *Scand J Gastroenterol*; 2006 [cited 2021 Dec 3];41:1421–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17101573/>
296. Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* [Internet]. *Cell*; 2008 [cited 2021 Dec 3];134:743–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18775308/>
297. Salzman NH. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: Détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* [Internet]. Taylor & Francis; 2010 [cited 2021 Dec 3];1:401. Available from: </pmc/articles/PMC3056107/>
298. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* [Internet]. *Nature*; 2008 [cited 2021 Dec 3];456:259–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18849966/>
299. Chileveru HR, Lim SA, Chairatana P, Wommack AJ, Chiang IL, Nolan EM. Visualizing attack of escherichia coli by the antimicrobial peptide human defensin 5. *Biochemistry* [Internet]. American Chemical Society; 2015 [cited 2021 Dec 3];54:1767–77. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi501483q>
300. Chu H, Pazgier M, Jung G, Nuccio SP, Castillo PA, De Jong MF, et al. Human  $\alpha$ -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* [Internet]. *Science*; 2012 [cited 2021 Dec 3];337:477–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22722251/>
301. Lee C-C, Sun Y, Qian S, Huang HW. Transmembrane Pores Formed by Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biophys J* [Internet]. The Biophysical Society; 2011 [cited 2021 Nov 5];100:1688. Available from: </pmc/articles/PMC3072607/>
302. Stephan A, Batinica M, Steiger J, Hartmann P, Zaucke F, Bloch W, et al. LL37:DNA complexes provide antimicrobial activity against intracellular bacteria in human macrophages. *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016;148:420–32.

303. Kopp ZA, Jain U, Van Limbergen J, Stadnyk AW. Do Antimicrobial Peptides and Complement Collaborate in the Intestinal Mucosa? *Front Immunol* [Internet]. Frontiers; 2015 [cited 2018 Dec 12];6:17. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00017/abstract>
304. Chromek M, Arvidsson I, Karpman D. The antimicrobial peptide cathelicidin protects mice from *Escherichia coli* O157:H7-mediated disease. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2012 [cited 2018 Oct 22];7:e46476. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23077510>
305. TC H, S H, DQ S, R I, M C, J C, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin modulates *Clostridium difficile*-associated colitis and toxin A-mediated enteritis in mice. *Gut* [Internet]. Gut; 2013 [cited 2021 Nov 5];62:1295–305. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22760006/>
306. Yoshimura T, McLean MH, Dzutsev AK, Yao X, Chen K, Huang J, et al. The Antimicrobial Peptide CRAMP Is Essential for Colon Homeostasis by Maintaining Microbiota Balance. *J Immunol* [Internet]. American Association of Immunologists; 2018 [cited 2019 Apr 29];200:2174–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29440355>
307. Shin JH, Seeley RJ. Reg3 Proteins as Gut Hormones? *Endocrinology* [Internet]. Oxford Academic; 2019 [cited 2021 Nov 17];160:1506–14. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/160/6/1506/5486630>
308. Parikh A, Stephan AF, Tzanakakis ES. Regenerating proteins and their expression, regulation and signaling. *Biomol Concepts* [Internet]. NIH Public Access; 2012 [cited 2021 Nov 17];3:57. Available from: </pmc/articles/PMC3348543/>
309. Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* [Internet]. J Exp Med; 2007 [cited 2021 Nov 8];204:1891–900. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17635956/>
310. Keir ME, Yi T, Lu TT, Ghilardi N. The role of IL-22 in intestinal health and disease. *J Exp Med*. 2020;217:1–9.
311. T J, Y S, Y G, K Y, J F, BB F, et al. Initial Gut Microbial Composition as a Key Factor Driving Host Response to Antibiotic Treatment, as Exemplified by the Presence or Absence of Commensal *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. Appl Environ Microbiol; 2017 [cited 2021 Nov 5];83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28667114/>
312. HL C, CV W, CL B, LV H. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* [Internet]. Science; 2006 [cited 2021 Nov 5];313:1126–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16931762/>
313. Darnaud M, Dos Santos A, Gonzalez P, Augui S, Lacoste C, Desterke C, et al. Enteric Delivery of Regenerating Family Member 3 alpha Alters the Intestinal Microbiota and Controls Inflammation in Mice With Colitis. *Gastroenterology* [Internet]. W.B. Saunders; 2018 [cited 2019 Jun 6];154:1009-1023.e14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508517363497?via%3Dihub>
314. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2000 [cited 2021 Nov 15];68:9–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.68.1.9>
315. Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 1989 [cited 2021 Nov 15];84:2017. Available from: </pmc/articles/PMC304087/?report=abstract>
316. García JRC, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, et al. Identification of a novel, multifunctional  $\beta$ -defensin (human  $\beta$ -defensin 3) with specific antimicrobial activity. *Cell Tissue Res* 2001 3062 [Internet]. Springer; 2001 [cited 2021 Nov 15];306:257–64. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004410100433>
317. García J-RC, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez F-J, Klüver E, Adermann K, et al. Human  $\beta$ -defensin 4: a

novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2001 [cited 2021 Nov 15];15:1819–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.00-0865fje>

318. De Yang B, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* [Internet]. The Rockefeller University Press; 2000 [cited 2021 Feb 1];192:1069–74. Available from: <http://www.jem.org/cgi/content/full/192/7/1069>

319. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins, and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Host Defense\*. *Annual Reviews* ; 2004 [cited 2021 Nov 16];22:181–215. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104603>

320. Agier J, Brzezińska-Błaszczuk E, Żelechowska P, Wiktorska M, Pietrzak J, Różalska S. Cathelicidin LL-37 Affects Surface and Intracellular Toll-Like Receptor Expression in Tissue Mast Cells. *J Immunol Res* [Internet]. Hindawi Limited; 2018 [cited 2018 Oct 23];2018:7357162. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29670923>

321. W Hancock Pistolic RE, Powers J-P, Bryan J, L Fiona M Roche FS, Mu R, Doho GH, et al. Modulation of the TLR-Mediated Inflammatory Response by the Endogenous Human Host Defense Peptide LL-37. 2006 [cited 2021 Nov 15]; Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/176/4/2455>  
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/176/4/2455#otherarticle16onlinearticlesthatcitethisarticlecanbeaccessedat:http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/176/4/2455%23BIBL>

322. Huang BL, Chandra S, Shih DQ. Skin Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Front Physiol* [Internet]. Frontiers Media SA; 2012 [cited 2021 Nov 15];3. Available from: [/pmc/articles/PMC3273725/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22737275/)

323. Koczulla R, Von Degenfeld G, Kupatt C, Krötzig F, Zahler S, Gloe T, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* [Internet]. *J Clin Invest*; 2003 [cited 2021 Nov 16];111:1665–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12782669/>

324. Heilborn JD, Frohm Nilsson M, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, et al. The cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* [Internet]. *J Invest Dermatol*; 2003 [cited 2021 Nov 16];120:379–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12603850/>

325. Grönberg A, Mahlapuu M, Stähle M, Whately-Smith C, Rollman O. Treatment with LL-37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Wound Repair Regen* [Internet]. Blackwell Publishing Inc.; 2014 [cited 2021 Feb 1];22:613–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25041740/>

326. Li J, Raghunath M, Tan D, Lareu RR, Chen ZC, Beuerman RW. Defensins HNP1 and HBD2 Stimulation of Wound-Associated Responses in Human Conjunctival Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. The Association for Research in Vision and Ophthalmology; 2006;47:3811–9.

327. Lai Y, Li D, Li C, Muehleisen B, Radek KA, Park HJ, et al. The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity* [Internet]. *Immunity*; 2012 [cited 2021 Nov 16];37:74–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22727489/>

328. Jiang Z, Liu Y, Li C, Chang L, Wang W, Wang Z, et al. IL-36 $\gamma$  Induced by the TLR3-SLUG-VDR Axis Promotes Wound Healing via REG3A. *J Invest Dermatol* [Internet]. *J Invest Dermatol*; 2017 [cited 2021 Nov 16];137:2620–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28774595/>

329. Wu Y, Quan Y, Liu Y, Liu K, Li H, Jiang Z, et al. Hyperglycaemia inhibits REG3A expression to exacerbate TLR3-

- mediated skin inflammation in diabetes. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2018 Oct 31];7:13393. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27830702>
330. Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Stange EF. Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* [Internet]. *Gut*; 2007 [cited 2021 Nov 15];56:1240–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456510/>
331. Tran DH-N, Wang J, Ha C, Ho W, Mattai SA, Oikonomopoulos A, et al. Circulating cathelicidin levels correlate with mucosal disease activity in ulcerative colitis, risk of intestinal stricture in Crohn's disease, and clinical prognosis in inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol* [Internet]. BioMed Central; 2017 [cited 2018 Dec 12];17:63. Available from: <http://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12876-017-0619-4>
332. Miani M, Le Naour J, Waeckel-Enée E, Verma S chand, Straube M, Emond P, et al. Gut Microbiota-Stimulated Innate Lymphoid Cells Support  $\beta$ -Defensin 14 Expression in Pancreatic Endocrine Cells, Preventing Autoimmune Diabetes. *Cell Metab* [Internet]. *Cell Metab*; 2018 [cited 2021 Nov 23];28:557-572.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30017352/>
333. Pound LD, Patrick C, Eberhard CE, Mottawea W, Wang GS, Abujamel T, et al. Cathelicidin Antimicrobial Peptide: A Novel Regulator of Islet Function, Islet Regeneration, and Selected Gut Bacteria. *Diabetes* [Internet]. *Diabetes*; 2015 [cited 2021 Nov 23];64:4135–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26370175/>
334. Liang W, Enée E, Andre-Vallee C, Falcone M, Sun J, Diana J. Intestinal Cathelicidin Antimicrobial Peptide Shapes a Protective Neonatal Gut Microbiota against Pancreatic Autoimmunity. *Gastroenterology* [Internet]. W.B. Saunders; 2021 [cited 2022 Jan 18]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508521041688>
335. Guo X, Li J, Tang R, Zhang G, Zeng H, Wood RJ, et al. High Fat Diet Alters Gut Microbiota and the Expression of Paneth Cell-Antimicrobial Peptides Preceding Changes of Circulating Inflammatory Cytokines. *Mediators Inflamm* [Internet]. Hindawi Limited; 2017 [cited 2018 Oct 18];2017:9474896. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28316379>
336. Tomas J, Mulet C, Saffarian A, Cavin JB, Ducroc R, Regnault B, et al. High-fat diet modifies the PPAR- $\gamma$  pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 2016 [cited 2021 Nov 22];113:E5934–43. Available from: <https://www.pnas.org/content/113/40/E5934>
337. Sala P, Torrinhas RS, Fonseca DC, Heymsfield S, Giannella-Neto D, Waitzberg DL. Type 2 Diabetes Remission After Roux-en-Y Gastric Bypass: Evidence for Increased Expression of Jejunal Genes Encoding Regenerating Pancreatic Islet-Derived Proteins as a Potential Mechanism. *Obes Surg* [Internet]. *Obes Surg*; 2017 [cited 2021 Nov 22];27:1123–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28213664/>
338. Ben-Zvi D, Meoli L, Abidi WM, Nestoridi E, Panciotti C, Castillo E, et al. Time-Dependent Molecular Responses Differ between Gastric Bypass and Dieting but Are Conserved Across Species. *Cell Metab* [Internet]. Cell Press; 2018 [cited 2021 Nov 22];28:310-323.e6. Available from: <http://www.cell.com/article/S1550413118303863/fulltext>
339. Secq V, Mallmann C, Gironella M, Lopez B, Closo D, Garcia S, et al. PAP/HIP Protein Is an Obesogenic Factor. *J Cell Physiol* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2014 [cited 2018 Oct 19];229:225–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.24438>
340. Huang Y, Qi HB, Zhang Z, Wang E, Yun H, Yan H, et al. Gut REG3 $\gamma$ -associated *Lactobacillus* induces anti-inflammatory macrophages to maintain adipose tissue homeostasis. *Front Immunol* [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2017 [cited 2021 Nov 22];8:1063. Available from: [/pmc/articles/PMC5591335/](https://pmc/articles/PMC5591335/)
341. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2006 [cited 2021 Nov 26];100:1171–85. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>

342. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014 118 [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2021 Nov 25];11:506–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>
343. Sonnenborn U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. Oxford Academic; 2016 [cited 2021 Nov 26];363:212. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article/363/19/fnw212/2236266>
344. Henker J, Laass M, Blokhin BM, Bolbot YK, Maydannik VG, Elze M, et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatr* [Internet]. Eur J Pediatr; 2007 [cited 2021 Nov 26];166:311–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17287932/>
345. Kruis W, Chrubasik S, Boehm S, Stange C, Schulze J. A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. *Int J Colorectal Dis* [Internet]. Springer; 2012 [cited 2021 Nov 26];27:467. Available from: </pmc/articles/PMC3307993/>
346. Podolsky SH. Metchnikoff and the microbiome. *Lancet* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2021 Nov 24];380:1810–1. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673612620182/fulltext>
347. de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Magalhães Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv*. Elsevier; 2018;36:2060–76.
348. Savaiano DA, Hutkins RW. Yogurt, cultured fermented milk, and health: a systematic review. *Nutr Rev* [Internet]. Oxford Academic; 2021 [cited 2021 Nov 25];79:599–614. Available from: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/79/5/599/5843523>
349. Song AAL, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Factories* 2017 161 [Internet]. BioMed Central; 2017 [cited 2021 Nov 25];16:1–15. Available from: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0669-x>
350. Touret T, Oliveira M, Semedo-Lemsaddek T. Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. *PLoS One* [Internet]. PLoS One; 2018 [cited 2021 Nov 25];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30192827/>
351. Park KY, Jeong JK, Lee YE, Daily JW. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J Med Food* [Internet]. J Med Food; 2014 [cited 2021 Nov 25];17:6–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24456350/>
352. Mathur H, Beresford TP, Cotter PD. Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients* [Internet]. Nutrients; 2020 [cited 2021 Nov 25];12:1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32512787/>
353. Nampoothiri KM, Beena DJ, Vasanthakumari DS, Ismail B. Health Benefits of Exopolysaccharides in Fermented Foods. *Fermented Foods Heal Dis Prev*. Elsevier Inc.; 2017;49–62.
354. Tok E, Aslim B. Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiol Immunol* [Internet]. Microbiol Immunol; 2010 [cited 2021 Nov 25];54:257–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20536722/>
355. Caggianiello G, Kleerebezem M, Spano G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016 1009 [Internet]. Springer; 2016 [cited 2021 Nov 25];100:3877–86. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7471-2>
356. Liao SF, Nyachoti M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim Nutr*. Elsevier; 2017;3:331–43.



357. Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, et al. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Front Microbiol*. Frontiers Media S.A.; 2019;10:57.
358. Luerce TD, Gomes-Santos AC, Rocha CS, Moreira TG, Cruz DN, Lemos L, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. *Gut Pathog* [Internet]. BioMed Central; 2014 [cited 2021 Nov 26];6:33. Available from: [/pmc/articles/PMC4126083/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26792758/)
359. Nishitani Y, Tanoue T, Yamada K, Ishida T, Yoshida M, Azuma T, et al. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2009 [cited 2021 Nov 26];9:1444–51. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/26792758\\_Lactococcus\\_lactis\\_subsp\\_cremoris\\_FC\\_alleviates\\_symptoms\\_of\\_colitis\\_induced\\_by\\_dextran\\_sulfate\\_sodium\\_in\\_mice](https://www.researchgate.net/publication/26792758_Lactococcus_lactis_subsp_cremoris_FC_alleviates_symptoms_of_colitis_induced_by_dextran_sulfate_sodium_in_mice)
360. Liu M, Zhang X, Hao Y, Ding J, Shen J, Xue Z, et al. Protective effects of a novel probiotic strain, *Lactococcus lactis* ML2018, in colitis: *in vivo* and *in vitro* evidence. *Food Funct* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2019 [cited 2019 May 13];10:1132–45. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8FO02301H>
361. Linares DM, Kok J, Poolman B. Genome Sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (Revised) and NZ9000 and Comparative Physiological Studies. *J Bacteriol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2010 [cited 2021 Nov 26];192:5806. Available from: [/pmc/articles/PMC2953693/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20211128/)
362. Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2007 [cited 2021 Nov 26];189:3256–70. Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JB.01768-06>
363. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* [Internet]. Science; 2000 [cited 2021 Nov 26];289:1352–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10958782/>
364. Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. Clin Gastroenterol Hepatol; 2006 [cited 2021 Nov 26];4:754–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16716759/>
365. Zhou XX, Li WF, Ma GX, Pan YJ. The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. *Biotechnol Adv* [Internet]. Biotechnol Adv; 2006 [cited 2021 Nov 26];24:285–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16380225/>
366. Kuipers OP, De Ruyter PGGA, Kleerebezem M, De Vos WM. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnol*. Elsevier; 1998;64:15–21.
367. Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Sugita-Konishi Y, Aibara K, et al. Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 1990 [cited 2021 Nov 30];58:2929. Available from: [/pmc/articles/PMC313589/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26792758/)
368. Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, Wells JM, Le Page RWF. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* 1997 157 [Internet]. Nature Publishing Group; 1997 [cited 2021 Nov 30];15:653–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt0797-653>
369. Norton PM, Wells JM, Brown HWG, Macpherson AM, Le Page RWF. Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* [Internet]. Vaccine; 1997 [cited 2021 Nov 30];15:616–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9178460/>
370. Cortes-Perez NG, Bermúdez-Humarán LG, Le Loir Y, Rodríguez-Padilla C, Gruss A, Saucedo-Cárdenas O, et al. Mice immunization with live lactococci displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. FEMS Microbiol Lett; 2003 [cited 2021 Nov 30];229:37–42. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14659540/>

371. Guimarães VD, Innocentin S, Lefèvre F, Azevedo V, Wal JM, Langella P, et al. Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*. American Society for Microbiology; 2006;72:7091–7.
372. Chatel JM, Pothelune L, Ah-Leung S, Corthier G, Wal JM, Langella P. In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Ther* [Internet]. Nature Publishing Group; 2008 [cited 2021 May 3];15:1184–90. Available from: [www.nature.com/gt](http://www.nature.com/gt)
373. Guimarães VD, Gabriel JE, Lefèvre F, Cabanes D, Gruss A, Cossart P, et al. Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes Infect* [Internet]. *Microbes Infect*; 2005 [cited 2021 Nov 30];7:836–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15878681/>
374. Innocentin S, Guimarães V, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Chatel JM, et al. *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. *Appl Environ Microbiol*; 2009 [cited 2021 Nov 30];75:4870–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19482952/>
375. Ul Hasan A, Rahman A, Kobori H. Interactions between Host PPARs and Gut Microbiota in Health and Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2019 [cited 2022 Mar 5];20. Available from: [/pmc/articles/PMC6359605/](http://pmc/articles/PMC6359605/)
376. Oh J-H, Schueler KL, Stapleton DS, Alexander LM, Yen C-LE, Keller MP, et al. Secretion of Recombinant Interleukin-22 by Engineered *Lactobacillus reuteri* Reduces Fatty Liver Disease in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity. *mSphere*. American Society for Microbiology; 2020;5.
377. Yang L, Zhang Y, Wang L, Fan F, Zhu L, Li Z, et al. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *J Hepatol* [Internet]. 2010 [cited 2020 Apr 10];53:339–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452699>
378. Wang X, Ota N, Manzanillo P, Kates L, Zavala-Solorio J, Eidenschenk C, et al. Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2019 Jun 5];514:237–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature13564>
379. Hasnain SZ, Borg DJ, Harcourt BE, Tong H, Sheng YH, Ng CP, et al. Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2020 Apr 10];20:1417–26. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.3705>
380. Park O, Ki SH, Xu M, Wang H, Feng D, Tam J, et al. Biologically active, high levels of interleukin-22 inhibit hepatic gluconeogenesis but do not affect obesity and its metabolic consequences. *Cell Biosci* [Internet]. BioMed Central Ltd.; 2015 [cited 2020 Apr 10];5:25. Available from: <http://www.cellandbioscience.com/content/5/1/25>
381. Hendrikx T, Duan Y, Wang Y, Oh JH, Alexander LM, Huang W, et al. Bacteria engineered to produce IL-22 in intestine induce expression of REG3G to reduce ethanol-induced liver disease in mice. *Gut*. 2018;1–12.
382. Bermúdez-Humarán LG, Aubry C, Motta JP, Deraison C, Steidler L, Vergnolle N, et al. Engineering lactococci and lactobacilli for human health [Internet]. *Curr Opin Microbiol*. *Curr Opin Microbiol*; 2013 [cited 2021 May 3]. p. 278–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23850097/>
383. Mancha-Agresti P, de Castro CP, dos Santos JSC, Araujo MA, Pereira VB, LeBlanc JG, et al. Recombinant invasive *Lactococcus lactis* carrying a DNA vaccine coding the Ag85A antigen increases INF- $\gamma$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  cytokines after intranasal immunization. *Front Microbiol* [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2017 [cited 2021 May 5];8. Available from: [/pmc/articles/PMC5504179/](http://pmc/articles/PMC5504179/)
384. De Azevedo M, Karczewski J, Lefèvre F, Azevedo V, Miyoshi A, Wells JM, et al. In vitro and in vivo characterization of DNA delivery using recombinant *Lactococcus lactis* expressing a mutated form of L.

- monocytogenes Internalin A. *BMC Microbiol* [Internet]. BioMed Central; 2012 [cited 2021 May 3];12:299. Available from: [/pmc/articles/PMC3541092/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22541092/)
385. de Azevedo M, Meijerink M, Tavernier N, Pereira VB, LeBlanc JG, Azevedo V, et al. Recombinant invasive *Lactococcus lactis* can transfer DNA vaccines either directly to dendritic cells or across an epithelial cell monolayer. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2015;33:4807–12.
386. Khan I, Ullah N, Zha L, Bai Y, Khan A, Zhao T, et al. Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): Cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome [Internet]. *Pathogens*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jan 17]. Available from: [/pmc/articles/PMC6789542/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35789542/)
387. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [Internet]. *Clin. J. Gastroenterol*. Springer Tokyo; 2018 [cited 2021 Jan 26]. p. 1–10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
388. Zhang M, Sun K, Wu Y, Yang Y, Tso P, Wu Z. Interactions between Intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease. *Front Immunol* [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2017 [cited 2021 Jan 27];8:1. Available from: [/pmc/articles/PMC5558048/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30558048/)
389. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. *J Immunol*. The American Association of Immunologists; 2013;191:4895–901.
390. Hancock REW, Falla TJ. Antimicrobial peptides: broad-spectrum antibiotics from nature THE CATIONIC PEPTIDES OF NATURE. *Clin. Microbiol. Infect*. 1996.
391. Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich K. The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Curr Pharm Des* [Internet]. Bentham Science Publishers Ltd.; 2009 [cited 2021 Jan 27];15:2377–92. Available from: <http://www.bbcm.univ.>
392. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, et al. Antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol*. Nature Publishing Group; 2007;127:594–604.
393. Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2003 [cited 2021 Jan 27]. p. 17–21. Available from: [www.annrheumdis.com](http://www.annrheumdis.com)
394. Mwangi J, Hao X, Lai R, Zhang ZY. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance [Internet]. *Zool. Res. NLM (Medline)*; 2019 [cited 2021 Jan 27]. p. 488–505. Available from: [/pmc/articles/PMC6822926/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36822926/)
395. Wang S, Zeng X, Yang Q, Qiao S. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry [Internet]. *Int. J. Mol. Sci*. MDPI AG; 2016 [cited 2021 Jan 27]. Available from: [/pmc/articles/PMC4881439/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34881439/)
396. Alford MA, Baquir B, Santana FL, Haney EF, Hancock REW. Cathelicidin Host Defense Peptides and Inflammatory Signaling: Striking a Balance [Internet]. *Front. Microbiol*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2021 Feb 1]. Available from: [/pmc/articles/PMC7481365/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37481365/)
397. Cheng Y, Prickett MD, Gutowska W, Kuo R, Belov K, Burt DW. Evolution of the avian  $\beta$ -defensin and cathelicidin genes. *BMC Evol Biol* [Internet]. BioMed Central; 2015 [cited 2021 Feb 1];15. Available from: [/pmc/articles/PMC4571063/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2571063/)
398. Huynh E, Penney J, Caswell J, Li J. Protective effects of protegrin in dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Front Pharmacol* [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2019 [cited 2021 Jan 17];10:156. Available from: [/pmc/articles/PMC6403130/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36403130/)
399. Wu J, Yang J, Wang X, Wei L, Mi K, Shen Y, et al. A frog cathelicidin peptide effectively promotes cutaneous wound healing in mice. *Biochem J* [Internet]. Portland Press Ltd; 2018 [cited 2021 Jan 17];475:2785–99. Available

from: /pmc/articles/PMC6134359/?report=abstract

400. Thennarasu S, Tan A, Penumatchu R, Shelburne CE, Heyl DL, Ramamoorthy A. Antimicrobial and membrane disrupting activities of a peptide derived from the human cathelicidin antimicrobial peptide LL37. *Biophys J. Biophysical Society*; 2010;98:248–57.
401. Braff MH, Zaiou M, Fierer J, Nizet V, Gallo RL. Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect Immun. American Society for Microbiology (ASM)*; 2005;73:6771–81.
402. Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J. European Respiratory Society*; 2015;45:1150–62.
403. Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res. NIH Public Access*; 2005;30:385–94.
404. Yoo JH, Ho S, Tran DH-Y, Cheng M, Bakirtzi K, Kubota Y, et al. Antifibrogenic Effects of the Antimicrobial Peptide Cathelicidin in Murine Colitis-Associated Fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol [Internet]. Elsevier*; 2015 [cited 2019 Apr 29];1:55-74.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352345X14000022?via%3Dihub>
405. Park HJ, Cho DH, Kim HJ, Lee JY, Cho BK, Bang SI, et al. Collagen synthesis is suppressed in dermal fibroblasts by the human antimicrobial peptide LL-37. *J Invest Dermatol [Internet]. Nature Publishing Group*; 2009 [cited 2021 Feb 2];129:843–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18923445/>
406. Sun L, Wang W, Xiao W, Yang H. The Roles of Cathelicidin LL-37 in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis [Internet]. Lippincott Williams and Wilkins*; 2016 [cited 2020 Mar 27];22:1986–91. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/22/8/1986-1991/4562046>
407. Fan TJ, Tchaptchet SY, Arsene D, Mishima Y, Liu B, Sartor RB, et al. Environmental factors modify the severity of acute DSS colitis in caspase-11-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis [Internet]. Oxford University Press*; 2018 [cited 2021 Jan 17];24:2394–403. Available from: /pmc/articles/PMC6185382/?report=abstract
408. Bilski J, Mazur-Bialy A, Brzozowski B, Magierowski M, Zahradnik-Bilska J, Wójcik D, et al. Can exercise affect the course of inflammatory bowel disease? Experimental and clinical evidence. *Pharmacol. Reports. Elsevier B.V.*; 2016. p. 827–36.
409. Sideri A, Stavrakis D, Bowe C, Shih DQ, Fleshner P, Arsenescu V, et al. Effects of obesity on severity of colitis and cytokine expression in mouse mesenteric fat. Potential role of adiponectin receptor 1. *Am J Physiol Liver Physiol [Internet]. 2015 [cited 2020 Jan 16];308:G591–604. Available from: https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00269.2014*
410. Llewellyn SR, Britton GJ, Contijoch EJ, Vennaro OH, Mortha A, Colombel JF, et al. Interactions Between Diet and the Intestinal Microbiota Alter Intestinal Permeability and Colitis Severity in Mice. *Gastroenterology [Internet]. W.B. Saunders*; 2018 [cited 2021 Jan 17];154:1037-1046.e2. Available from: /pmc/articles/PMC5847454/?report=abstract
411. Munyaka PM, Eissa N, Bernstein CN, Khafipour E, Ghia JE. Antepartum antibiotic treatment increases offspring susceptibility to experimental colitis: A role of the gut microbiota. *PLoS One [Internet]. Public Library of Science*; 2015 [cited 2021 Jan 17];10. Available from: /pmc/articles/PMC4659638/?report=abstract
412. Mandal SM, Silva ON, Franco OL. Recombinant probiotics with antimicrobial peptides: A dual strategy to improve immune response in immunocompromised patients [Internet]. *Drug Discov. Today. Elsevier Ltd*; 2014 [cited 2020 Mar 28]. p. 1045–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644614002268>
413. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science (80- ). American Association for the Advancement of Science*; 1965;147:747–8.

414. Carvalho RDDO, do Carmo FLR, Junior A de O, Langella P, Chatel JM, Bermúdez-Humarán LG, et al. Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis [Internet]. *Front. Microbiol. Frontiers Media S.A.*; 2017 [cited 2021 May 3]. Available from: [/pmc/articles/PMC5422521/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3422521/)
415. Tavares LM, de Jesus LCL, da Silva TF, Barroso FAL, Batista VL, Coelho-Rocha ND, et al. Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model [Internet]. *Front. Bioeng. Biotechnol. Frontiers Media S.A.*; 2020 [cited 2021 Jan 27]. p. 517166. Available from: [/pmc/articles/PMC7672206/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3422521/)
416. Bermúdez-Humarán LG, Nouaille S, Zilberfarb V, Corthier G, Gruss A, Langella P, et al. Effects of intranasal administration of a leptin-secreting *Lactococcus lactis* recombinant on food intake, body weight, and immune response of mice. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. *Appl Environ Microbiol*; 2007 [cited 2021 May 3];73:5300–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17601816/>
417. Wong CCM, Zhang L, Li ZJ, Wu WKK, Ren SX, Chen YC, et al. Protective effects of cathelicidin-encoding *Lactococcus lactis* in murine ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2012 [cited 2018 Dec 12];27:1205–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507188>
418. Li J, Yu S, Pan X, Zhang M, Lv Z, Pan LL, et al. Recombinant CRAMP-producing *Lactococcus lactis* attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis by colonic colonization and inhibiting p38/NF- $\kappa$ B signaling. *Food Nutr Res* [Internet]. *Food Nutr Res*; 2021 [cited 2022 Jan 24];65:1–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34650393/>
419. Rodrigues VF, Bahia MPS, Cândido NR, Moreira JMP, Oliveira VG, Araújo ES, et al. Acute infection with *Strongyloides venezuelensis* increases intestine production IL-10, reduces Th1/Th2/Th17 induction in colon and attenuates Dextran Sulfate Sodium-induced colitis in BALB/c mice. *Cytokine. Academic Press*; 2018;111:72–83.
420. Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science (80- )* [Internet]. *American Association for the Advancement of Science*; 2017 [cited 2021 Jan 17];356:513–9. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/356/6337/513>
421. Krawiec P, Pac-Kożuchowska E. Serum interleukin 17A and interleukin 17F in children with inflammatory bowel disease. *Sci Rep* [Internet]. *Nature Research*; 2020 [cited 2021 Jan 17];10:12617. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69567-x>
422. Canavan TN, Elmets CA, Cantrell WL, Evans JM, Elewski BE. Anti-IL-17 Medications Used in the Treatment of Plaque Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Comprehensive Review [Internet]. *Am. J. Clin. Dermatol. Springer International Publishing*; 2016 [cited 2021 Jan 17]. p. 33–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26649440/>
423. Wang J, Bhatia A, Cleveland NK, Gupta N, Dalal S, Rubin DT, et al. Rapid Onset of Inflammatory Bowel Disease after Receiving Secukinumab Infusion. *ACG Case Reports J* [Internet]. *Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health)*; 2018 [cited 2021 Jan 17];5:e56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30105273/>
424. Targan SR, Feagan B, Vermeire S, Panaccione R, Melmed GY, Landers C, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study of brodalumab in patients with moderate-to-severe Crohn’s disease. *Am J Gastroenterol* [Internet]. *Nature Publishing Group*; 2016 [cited 2021 Jan 17];111:1599–607. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27481309/>
425. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PDR, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn’s disease: Unexpected results of a randomised, double-blind placebo- controlled trial. *Gut* [Internet]. *Gut*; 2012 [cited 2021 Apr 12];61:1693–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22595313/>
426. Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol. Academic Press Inc.*; 2004;110:55–62.

427. Whibley N, Gaffen SL. Gut-Busters: IL-17 Ain't Afraid of No IL-23. *Immunity*. Cell Press; 2015. p. 620–2.
428. Park CH, Lee A reum, Ahn SB, Eun CS, Han DS. Role of innate lymphoid cells in chronic colitis during anti-IL-17A therapy. *Sci Rep [Internet]*. Nature Research; 2020 [cited 2021 May 17];10. Available from: [/pmc/articles/PMC6962146/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35090380/)
429. Tachibana M, Watanabe N, Koda Y, Oya Y, Kaminuma O, Katayama K, et al. Ablation of IL-17A leads to severe colitis in IL-10-deficient mice: Implications of myeloid-derived suppressor cells and NO production. *Int Immunol [Internet]*. Oxford University Press; 2019 [cited 2021 May 17];32:187–201. Available from: [/pmc/articles/PMC7067553/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35090380/)
430. Minns D, Smith KJ, Alessandrini V, Hardisty G, Melrose L, Jackson-Jones L, et al. The neutrophil antimicrobial peptide cathelicidin promotes Th17 differentiation. *Nat Commun [Internet]*. Nature Research; 2021 [cited 2021 May 17];12:1–16. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21533-5>
431. Miyoshi A, Poquet I, Azevedo V, Commissaire J, Bermudez-Humaran L, Domakova E, et al. Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol [Internet]*. American Society for Microbiology (ASM); 2002 [cited 2021 Jun 8];68:3141–6. Available from: [/pmc/articles/PMC123920/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35090380/)
432. Meynier M, Baudu E, Rolhion N, Defaye M, Straube M, Daugey V, et al. AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms. *Gut Microbes [Internet]*. Gut Microbes; 2022 [cited 2022 Feb 8];14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35090380/>
433. Wrzosek L, Ciocan D, Borentain P, Spatz M, Puchois V, Hugot C, et al. Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota OPEN. 2018 [cited 2020 Jan 17];8:6854. Available from: [www.nature.com/scientificreports/](https://www.nature.com/scientificreports/)
434. JL W, WK M, GP M, PL B. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology [Internet]*. Gastroenterology; 1989 [cited 2021 Jul 19];96:29–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2535830/>
435. Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol [Internet]*. American Society for Microbiology; 1997 [cited 2020 Nov 13];63:2802–13. Available from: [/pmc/articles/PMC168577/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2535830/)
436. Afgan E, Baker D, Batut B, Van Den Beek M, Bouvier D, Ech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res [Internet]*. Oxford University Press; 2018 [cited 2020 Nov 13];46:W537–44. Available from: <https://galaxyproject.org>
437. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics [Internet]*. Oxford University Press; 2018 [cited 2020 Nov 16];34:1287–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29228191/>
438. Cullen TW, Schofield WB, Barry NA, Putnam EE, Rundell EA, Trent MS, et al. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science [Internet]*. NIH Public Access; 2015 [cited 2022 Mar 6];347:170. Available from: [/pmc/articles/PMC4388331/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29228191/)
439. Koon HW, Shih DQ, Chen J, Bakirtzi K, Hing TC, Law I, et al. Cathelicidin Signaling via the Toll-Like Receptor Protects Against Colitis in Mice. *Gastroenterology [Internet]*. NIH Public Access; 2011 [cited 2022 Apr 15];141:1852. Available from: [/pmc/articles/PMC3199285/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29228191/)
440. Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, et al. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. Biochem Biophys Res Commun; 2008 [cited 2021 Apr 12];377:12–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18796297/>
441. Ye M, Joosse ME, Liu L, Sun Y, Dong Y, Cai C, et al. Deletion of IL-6 Exacerbates Colitis and Induces Systemic Inflammation in IL-10-Deficient Mice. *J Crohn's Colitis [Internet]*. Oxford Academic; 2020 [cited 2022 Mar

7];14:831–40. Available from: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/14/6/831/5611236>

442. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Kuroda M, Kokura S, Ichikawa H, et al. Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. *Int J Mol Med* [Internet]. Spandidos Publications; 2004 [cited 2022 Mar 7];14:191–6. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.14.2.191/abstract>

443. Carvalho RD, Breyner N, Menezes-Garcia Z, Rodrigues NM, Lemos L, Maioli TU, et al. Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. *Microb Cell Fact* [Internet]. BioMed Central; 2017 [cited 2019 Jan 2];16:27. Available from: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0624-x>

444. Breyner NM, Vilas Boas PB, Fernandes G, de Carvalho RD, Rochat T, Michel ML, et al. Oral delivery of pancreatitis-associated protein by *Lactococcus lactis* displays protective effects in dinitro-benzenesulfonic-acid-induced colitis model and is able to modulate the composition of the microbiota. *Environ Microbiol* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2019 [cited 2022 Apr 18];21:4020. Available from: </pmc/articles/PMC6899824/>

445. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* (80- ) [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2013 [cited 2022 Apr 18];342:967–70. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1240527>

446. Derosa L, Routy B, Thomas AM, Iebba V, Zalcman G, Friard S, et al. Intestinal *Akkermansia muciniphila* predicts clinical response to PD-1 blockade in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Nat Med* 2022 282 [Internet]. Nature Publishing Group; 2022 [cited 2022 Apr 18];28:315–24. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01655-5>

447. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Dailière R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* [Internet]. Science; 2018 [cited 2022 Apr 18];359:91–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29097494/>

448. Eberl C, Ring D, Münch PC, Beutler M, Basic M, Slack EC, et al. Reproducible Colonization of Germ-Free Mice With the Oligo-Mouse-Microbiota in Different Animal Facilities. *Front Microbiol*. Frontiers Media S.A.; 2020;10:2999.

449. Iimura M, Gallo RL, Hase K, Miyamoto Y, Eckmann L, Kagnoff MF. Cathelicidin Mediates Innate Intestinal Defense against Colonization with Epithelial Adherent Bacterial Pathogens. *J Immunol* [Internet]. American Association of Immunologists; 2005 [cited 2022 Apr 18];174:4901–7. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/174/8/4901>

450. Jiang Y, Wan Y, Li J, Zhao Y, Ma Y, Yu J, et al. Alterations in Intestinal Microbiota Composition in Mice Treated With Vitamin D3 or Cathelicidin. *Front Oncol*. Frontiers Media S.A.; 2021;11:5220.

451. Gubatan J, Mehigan GA, Villegas F, Mitsuhashi S, Longhi MS, Malvar G, et al. Cathelicidin Mediates a Protective Role of Vitamin D in Ulcerative Colitis and Human Colonic Epithelial Cells. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. Oxford Academic; 2020 [cited 2022 Apr 15];26:885–97. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/26/6/885/5709590>

452. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* [Internet]. Diabetes; 1988 [cited 2022 Apr 18];37:1163–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3044882/>

453. Bluemel S, Wang L, Martino C, Lee S, Wang Y, Williams B, et al. The Role of Intestinal C-type Regenerating Islet Derived-3 Lectins for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun* [Internet]. John Wiley and Sons Inc; 2018 [cited 2022 Feb 16];2:393–406. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep4.1165>

454. Ballal SA, Veiga P, Fenn K, Michaud M, Kim JH, Gallini CA, et al. Host lysozyme-mediated lysis of *Lactococcus*

*lactis* facilitates delivery of colitis-attenuating superoxide dismutase to inflamed colons. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 2015 [cited 2022 Mar 22];112:7803–8. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1501897112](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1501897112)

455. Naudin CR, Maner-Smith K, Owens JA, Wynn GM, Robinson BS, Matthews JD, et al. *Lactococcus lactis* Subspecies *cremoris* Elicits Protection Against Metabolic Changes Induced by a Western-Style Diet. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2022 Mar 22];159:639–651.e5. Available from: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508520303309/fulltext>

456. Seok Yu J, Soo Youn G, Choi J, Kim C-H, Yong Kim B, Yang S-J, et al. *Lactobacillus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*-driven reprogramming of gut microbiome and metabolome ameliorates the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Transl Med* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2021 [cited 2022 Mar 22];11:e634. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ctm2.634>

457. Sayon-Orea C, Martínez-González MA, Ruiz-Canela M, Bes-Rastrollo M. Associations between Yogurt Consumption and Weight Gain and Risk of Obesity and Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Adv Nutr* [Internet]. Oxford Academic; 2017 [cited 2022 Apr 18];8:146S–154S. Available from: <https://academic.oup.com/advances/article/8/1/146S/4566579>

458. Zhao F, Song S, Ma Y, Xu X, Zhou G, Li C. A short-term feeding of dietary casein increases abundance of *Lactococcus lactis* and upregulates gene expression involving obesity prevention in cecum of young rats compared with dietary chicken protein. *Front Microbiol*. Frontiers Media S.A.; 2019;10:2411.

459. Lagkouvardos I, Lesker TR, Hitch TCA, Gálvez EJC, Smit N, Neuhaus K, et al. Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family. *Microbiome* [Internet]. BioMed Central Ltd.; 2019 [cited 2022 Mar 7];7:1–15. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-019-0637-2>

460. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health [Internet]. *Front. Immunol*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2021 Apr 12]. p. 906. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

461. Chung YW, Gwak HJ, Moon S, Rho M, Ryu JH. Functional dynamics of bacterial species in the mouse gut microbiome revealed by metagenomic and metatranscriptomic analyses. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2020 [cited 2022 Mar 7];15:e0227886. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0227886>

462. Xiao Y, Huang X, Zhao Y, Chen F, Sun M, Yang W, et al. Interleukin-33 Promotes REG3 $\gamma$  Expression in Intestinal Epithelial Cells and Regulates Gut Microbiota. 2019 [cited 2022 Feb 21]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.02.006>

463. Hwang S, He Y, Xiang X, Seo W, Kim SJ, Ma J, et al. Interleukin-22 Ameliorates Neutrophil-Driven Nonalcoholic Steatohepatitis Through Multiple Targets. *Hepatology* [Internet]. Hepatology; 2020 [cited 2022 Mar 7];72:412–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31705800/>

464. Sargent J. IL-22 and metabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 5];10:639–639. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrendo.2014.148>

465. Avitabile S, Odorisio T, Madonna S, Eyerich S, Guerra L, Eyerich K, et al. Interleukin-22 Promotes Wound Repair in Diabetes by Improving Keratinocyte Pro-Healing Functions. *J Invest Dermatol*. Elsevier; 2015;135:2862–70.

466. McGee HM, Schmidt BA, Booth CJ, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, et al. IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin. *J Invest Dermatol*. Nature Publishing Group; 2013;133:1321–9.

467. Mizoguchi A. Healing of intestinal inflammation by IL-22. *Inflamm. Bowel Dis*. NIH Public Access; 2012. p. 1777–84.



468. Liang SC, Nickerson-Nutter C, Pittman DD, Carrier Y, Goodwin DG, Shields KM, et al. IL-22 Induces an Acute-Phase Response. *J Immunol* [Internet]. American Association of Immunologists; 2010 [cited 2022 Apr 19];185:5531–8. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/185/9/5531>
469. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, et al. Interleukin-22, a Member of the IL-10 Subfamily, Induces Inflammatory Responses in Colonic Subepithelial Myofibroblasts. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier; 2005 [cited 2022 Apr 18];129:969–84. Available from: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508505013594/fulltext>
470. Dalmas E, Venteclef N, Caer C, Poitou C, Cremer I, Aron-Wisnewsky J, et al. T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: Relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. American Diabetes Association Inc.; 2014;63:1966–77.

