



**HAL**  
open science

# Invasion de l'épithélium intestinal par des bactéries commensales du microbiote et impact sur la physiologie intestinale

Robin Louail

► **To cite this version:**

Robin Louail. Invasion de l'épithélium intestinal par des bactéries commensales du microbiote et impact sur la physiologie intestinale. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR084 . tel-04033760

**HAL Id: tel-04033760**

**<https://theses.hal.science/tel-04033760>**

Submitted on 17 Mar 2023

**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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

### **Invasion de l'épithélium intestinal par des bactéries commensales du microbiote et impact sur la physiologie intestinale**

**Présentée et soutenue par  
ROBIN LOUAIL**

**Thèse soutenue le 15/12/2022  
devant le jury composé de**

MME CRISTEL ARCHAMBAUD	CHARGE DE RECHERCHE, INRA PARIS	Rapporteur du jury
MME MURIEL THOMAS	DIRECTEUR DE RECHERCHE, INRA PARIS	Rapporteur du jury
M. MOISE COEFFIER	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. OLIVIER DUSSURGET	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, INSTITUT PASTEUR	Membre du jury
MME MARTINE PESTEL-CARON	PUPH DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. DAVID RIBET	CHARGE DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par DAVID RIBET (NUTRITION, INFLAMMATION ET AXE MICROBIOTE  
INTESTIN-CERVEAU)**



*失败不是倒下, 而是拒绝起来*

*L'échec n'est pas de tomber, mais de ne pas se relever – proverbe chinois*

*“I have not failed, I've just found 10.000 ways that won't work“ – Thomas  
Eddison*

*“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own  
reason for existence. One cannot help but be in awe when he contemplates  
the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is  
enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day.”*

*– Albert Einstein*

# Remerciements

Ce travail de thèse a été rendu possible par les nombreuses personnes qui m'ont apporté leur soutien non seulement au cours de ces années de doctorat, mais aussi parfois bien avant.

Je remercie les **Drs. Cristel Archambaud** et **Muriel Thomas** ainsi que les **Prs. Martine Pestel-Caron** et **Olivier Dussurget** pour avoir accepté d'évaluer ces travaux.

Je remercie toute l'équipe de l'UMR 1073 ADEN, dont l'ambiance de vie et les conditions de travail en font une place particulière. Se sentir à l'aise au travail, avec l'ensemble des collègues, est une chance. Ceci a d'autant plus été important que les conditions de vie et de travail ont été profondément affectées par la pandémie liée aux SARS-Cov2 et les mesures qui ont été prises en lien.

Je remercie le **Pr. Pierre Déchelotte** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire lors de mon Master 2 en provenance de l'université de Brest, me donnant l'opportunité de découvrir le fonctionnement de l'U1073. Je le remercie pour toute sa bienveillance et sa générosité. Un grand merci au **Pr. Moïse Coëffier** pour l'exemple qu'il a pu me donner, d'effort au travail, de maîtrise des sujets tout en étant le plus abordable du monde pour discuter de tout. La quantité de travail assumé m'aura impressionné et j'imagine le labo continuer son bon développement au cours des prochaines années sous ta direction. Merci au **Dr. Rachel Marion-Letellier** pour sa bonne humeur et son énergie, son sens du partage et surtout sa bonté envers les étudiants. Je pense que tu es aussi l'une des raisons qui fait que l'U1073 attire autant d'étudiants en stage.

Un merci spécial pour le **Dr. David Ribet**. En m'acceptant en Master, tu m'as offert la chance de pouvoir effectuer un stage près de ma famille dans un environnement de travail exceptionnel. L'ouverture d'une place en thèse sur ma thématique de travail par la suite était inattendue et encore une fois, tu as accepté de m'offrir la possibilité de travailler avec toi dans le contexte d'une thèse. Je ne pourrai pas te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi, notamment du début de stage à la fin de rédaction qui n'a pas été facile, en passant par les confinements qui ont émaillé ces travaux. Un grand merci pour ton aide, ta bienveillance et ta mansuétude tout au long de ces années.

Merci à **Sabine Douville** et **Sylvie Martins** pour toute leur gentillesse. Merci pour toute l'aide avec les papiers qui m'effraie tant, votre disponibilité, et votre attention portée à mes

problèmes. Merci également à vous deux pour votre implication et vos efforts dans les activités réunissant le labo aux cours de l'année, la réduction de ces moments de convivialités ces dernières années ne les a que rendus que plus important.

Merci à **Christine Bôle-Feysot** pour toute sa gentillesse. Tu as toujours prêté attention à mon confort dans les manips aux labos et chercher à améliorer celui-ci autant que possible. Merci à toi aussi pour avoir partagé tes expériences et ton savoir-faire technique. Merci également à **Charlène Guérin** pour nos conversations sur les piqures, les médecins, et toutes ces choses qui ne sont pas forcément très drôles mais un peu tout de même. Tu es plus forte que tu ne sembles le penser, je te souhaite le meilleur dans ton nouveau domaine. Merci au **Dr. Alexis Goichon**, compagnon des journées de la fête de la science pour mon arrivé et mon départ de l'unité, pour tout l'aide que tu as pareillement pu m'apporter durant mon séjour.

Merci à vous trois pour tous ces autoclaves et encore plus à vous les filles pour tous ces bouchons cardés.

Merci aux résidents et résidentes de l'aquarium, **Marion Hure**, **Charles-Edward Breemeersch** et **Kanhia Auble**, pour votre gentillesse et tout votre travail au labo.

Merci au **Dr. Jonathan Breton** pour son humour, son exemple comme jeune maître de conférences et des aléas qui vont avec, ainsi que pour son implication dans l'organisation des activités du labo. Un grand merci également pour ton implication dans la mise en pratique de nos protocoles *in-vivo*. Merci au complice, le **Dr. Ludovic Langlois** pour ses blagues et sa positivité, j'espère que tu pourras poursuivre tes travaux aux labos de manière pérenne.

Merci au **Dr. Najate Achamrah** pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son accessibilité. Ça a toujours été plaisant de pouvoir profiter de ton point de vue de clinicienne durant nos réunions biblio.

Merci aux occupants du bureau E6, **Mathilde Leboutte**, **Candice Lefebvre**, **Adrien Noël** et **Colin Salaün**. **Mathilde**, je te remercie encore une fois pour ton expertise précieuse du monde murin, très précieuse sur cette fin d'année. **Adrien**, désolé de ne pas avoir pu être d'une plus grande aide avec tes levures et encore merci à toi d'être venu à notre mariage. **Candice**, j'espère que ça s'améliorera pour toi, essaie de profiter du reste de ta thèse, ça vaut le coup. Un merci particulier à **Colin**, nous sommes restés ensemble depuis le Master 2 et tout au long de cette aventure, tu as été d'un grand soutien, toujours trop plein d'énergie positive. On ne peut pas savoir ce qui se serait passé si tu avais pris une autre décision, mais je pense que tout le

monde s'accorde pour dire que la recherche et l'encadrement d'étudiants te réussissent très bien, et je suis bien content de t'avoir eu au labo durant ces 4 dernières années. Encore merci à vous tous pour votre assistance précieuse dans la gestion des animaux.

Merci à celles et à ceux qui ont fait vivre le bureau du fond. A **Léa Loison** à qui je souhaite le meilleur avec *S. warneri* et que je remercie énormément pour l'aide indispensable apportée avec nos souris. Ton sumo va vivre un peu plus en paix à présent. A **Axelle Liébaut**, dont les conversations m'ont beaucoup appris, tant en microbiologie Caen sciences culinaires. A **Virginie Dreux**, gardienne du bureau, j'ai beaucoup apprécié de te voir rapporter les neurosciences dans nos thèmes de recherche. Aux petites nouvelles et petits nouveaux, **Léna Rousseau** et le **Dr. Heithem Soliman** qui vont pouvoir profiter d'un peu de quiétude. Merci au **Dr. Nicolas Richard** pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

A **Nadine Montbrion**, merci à toi pour avoir surmonté ton stage de M1 et pour le travail que tu y as réalisé. Je suis ravi de voir que tu as trouvé goût au travail de laboratoire, tu as mes meilleurs vœux pour la réalisation de ta thèse.

Un grand merci aussi à **Amélie Cresson**, pour tout son travail sur le présent projet. Je suis très content que ton stage t'ait suffisamment plu pour revenir au sein de l'unité. Peut-être que l'expérience du M2 t'amènera à considérer la réalisation d'une thèse. Je pense que tu as toutes les qualités pour celle-ci.

Un merci à notre Louvaniste le **Dr. Fabien Wuestenberghs**, tu auras vraiment mérité ce diplôme, entre les aléas de l'animalerie et ceux des politiques, tes années n'auront pas été tendres. J'ai apprécié nos discussions et ta camaraderie durant ces années particulières.

Je remercie les étudiants passés par le labo qui ont soutenu leur thèse quand j'ai rejoint le labo, les docteurs **Wafa Bahlouli**, **Emmeline Salameh**, **Marie Galmiche**, **Manon Dominique**, **Clément Lhuillier**, **Pauline Tirelle** et **Asma Amamou**. Vous m'avez accueilli chaleureusement et permis de voir ce qu'était le travail de thèse. Je pense tout particulièrement à toi **Asma** et tout cet investissement, où l'émotion était parfois difficile à supporter, qu'il me semble a payé à sa juste valeur. **Manon** je te remercie encore pour ton altruisme, ta gentillesse et l'aide que tu as pu m'apporter personnellement et collectivement dans la réalisation des JED.

Un merci particulier au **Dr. Chaïma Ezzine** avec qui j'ai partagé le bureau durant la majorité de ces années particulières. Il y a eu beaucoup d'émotions au cours de cette période

mais, à la fin, tout s'est bien arrangé. Je suis toujours convaincu que par ta capacité à travailler et ne pas baisser les bras, tu arriveras à avoir ce que tu désires. Je te souhaite le meilleur à toi, **Mohammed** et toute la famille.

Merci aux « anciennes » du labo, la licorne du Nord et au dragon de Bourgogne. **Marine Jarbeau**, de mon arrivée en Master à ton départ, tu as fait rayonner le laboratoire de ton énergie et de ta bonne humeur. Il est dommage pour nous que tu n'aies pas pu rester plus longtemps. **Alice Beau**, j'espère que l'on ne t'aura pas trop éprouvé avec Colin. La pièce de microbio était bien triste sans vos fromages. Je n'oublierai pas la blague de ton départ !

Merci à **Nicolas Vautrin**, tes connaissances et ton aide ont toujours été très appréciés. Pouvoir communiquer avec un autre doctorant en microbiologie a vraiment été un plus pour moi. Faire des blagues sur le nom de l'unité également. En tout cas félicitation à toi et **Manon** et bonne chance pour la suite !

Un merci aux collègues qui ont partagé le bureau des masters lors du début de cette aventure, **Mauranne Lelouard, Floriane Pingeont, Charlotte Desprez, Mathilde Pala** et **Zoé Racine**. **Zoé** merci à toi pour toute ta franchise et ta gentillesse. Ton énergie et ton fair-play m'ont quelque peu manqué au cours de la thèse, mais ton soutien a été là tout du long. Je suis content que tu sois allée au bout de ton projet professionnel et je te souhaite le même succès dans toutes tes entreprises.

Merci à **Gaëlle Rousseau** pour sa bonne humeur, son énergie durant son séjour au laboratoire.

Un grand merci à **Alexandra Elbakyan** qui rend possible le travail de recherche. Je suis très reconnaissant de son courage et de sa volonté de permettre une recherche ouverte à tous.

Un merci au **Pr. Mohammed Jebbard** pour m'avoir accepté en Master 1 à Brest alors que j'avais quitté le domaine des études. Sans la chance qui m'a été donnée à ce moment, je ne serais évidemment pas là aujourd'hui. Merci également à tous mes camarades de promotion, **Ewen Crequer, Amandine Morot, Severine Mares, Julien Barillere, Nicolas Frotté, Ambre Da Sylva, Amandine Sanvoisin, Emeline Vidal, Amina Ahmed** et **Paul Perrot**.

Un grand merci aux **Drs Anne Grosbouillot** et **Xavier Janvier** pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de M1 et de la qualité de leur accompagnement. Ce stage en microbiologie a confirmé que je voulais faire de la recherche mon métier.



Evidemment je tiens à remercier toute ma famille : Mes oncles et mes tantes, mes cousines et mes cousins. **Amélie**, tu m'as convaincu de ne pas abandonner ce que je voulais faire et à retourner vers les études. Je t'en remercie énormément. **Hugo** et **Mylène** merci à vous pour toutes les soirées et toute l'aide que vous m'avez toujours apportée.

Un grand merci à ma grand-mère qui m'a toujours soutenu et aidé dans tout ce que j'ai pu faire.

Un grand merci à mes frères qui m'ont toujours soutenu et à qui je souhaite le meilleur.

Un grand merci qui sera pour toujours insuffisant à mes parents pour m'avoir offert toutes ses chances dans la vie, de m'avoir toujours soutenu, encouragé et aidé dans toutes mes activités. Je vous dois tout.

Enfin, un grand merci à ma femme, pour tout le support qu'elle a pu m'apporter dans des conditions difficiles et les sacrifices réalisés. Merci à toi pour ton courage, ta force et ta tendresse.

# Table des matières

<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>5</b>
<b>I - L'environnement intestinal .....</b>	<b>7</b>
I.I Anatomie et physiologie de l'intestin.....	7
I.I.1 Anatomie générale de l'intestin.....	7
I.I.2 Diversité tissulaire de l'intestin.....	9
I.I.3 Diversité des types cellulaires de l'épithélium intestinal.....	11
I.II La barrière intestinale.....	19
I.II.1 Barrière physique.....	21
I.II.2 Barrière chimique .....	23
I.II.3 Barrière immunitaire .....	25
I.II.4 Atteintes de la barrière intestinales par les bactéries .....	27
I.III Modèles intestinaux .....	27
I.III.1 Lignées cellulaires .....	27
I.III.2 Modèles de co-cultures .....	31
I.III.3 Les organoïdes .....	33
I.III.4 Organ-on-Chip.....	35
I.III.5 L'ex vivo et l'in vivo .....	37
I.IV Le microbiote intestinal.....	37
I.IV.1 Composition.....	39
I.IV.2 Rôle du microbiote intestinal .....	43
I.IV.3 Dysbiose intestinale et pathologies.....	49
<b>II – Interactions hôte-bactéries intestinales.....</b>	<b>51</b>
II.I Détection et réponse à la présence de bactéries pathogènes .....	51
II.I.1 Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR).....	51
II.I.2 Capturer les éléments extracellulaires .....	59
II.I.3 Élimination des pathogènes phagocytés .....	67
II.II Pathogènes utilisant la phagocytose comme moyen d'entrée dans la cellule.....	67
II.III Mécanismes d'internalisation de bactéries dans les cellules non-phagocytaires.....	71
II.III.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	71
II.III.2 <i>Salmonella enterica</i> .....	75
II.III.3 L'autophagie .....	79
II.III.4 Bactéries du microbiote intestinal et capacité d'internalisation dans les cellules épithéliales ....	81
<b>III. Les Staphylocoques et les Lactobacilles .....</b>	<b>84</b>
III.I Les Staphylocoques.....	84

III.I.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	86
III.I.2 Internalisation de <i>S. aureus</i> dans les cellules non-phagocytaires de l'hôte .....	88
III.I.3 Internalisation des CoNS dans les cellules non-phagocytaires de l'hôte .....	90
III.II Les <i>Lactobacillus</i> .....	92
<b>Objectifs .....</b>	<b>96</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>98</b>
<b>Article I .....</b>	<b>99</b>
<b>Article II .....</b>	<b>124</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>139</b>
<b>Limite des modèles expérimentaux.....</b>	<b>140</b>
<b>Internalisation de <i>Staphylococcus warneri</i> .....</b>	<b>145</b>
Implication potentielle des autolysines dans l'internalisation de <i>Staphylococcus warneri</i> .....	146
Stratégies potentielles d'identification des mécanismes d'internalisation de <i>S. warneri</i> .....	146
<b>Capacité d'internalisation des <i>Lactobacillaceae</i>.....</b>	<b>148</b>
<b>Conséquences de l'internalisation de bactéries du microbiote sur la physiologie intestinale....</b>	<b>150</b>
<b>Les concepts de bactéries commensales, pathogènes opportunistes et pathobiontes.....</b>	<b>152</b>
<b>Les bactéries non-pathogènes : un rôle dans l'évolution de la cellule eucaryote ? .....</b>	<b>156</b>
<b>Importance du concept d'internalisation de bactéries non pathogènes .....</b>	<b>157</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>159</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>179</b>
<b>Communication orale 17ème congrès de la SFM :.....</b>	<b>180</b>
<b>Communication orale 24ème édition des Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie</b>	
<b>Intégrative, Santé, Environnement (ED 497) : .....</b>	<b>181</b>
<b>Curriculum vitae.....</b>	<b>182</b>

# Liste des abréviations

ALR	: Absent in melanoma-2-Like Receptor
ASC	: Adult Stem Cells
Atl	: Autolysin
Caco2	: Cancer Coli 2
CAR	: Coxsackoe and Adenovirus Receptor protein
CavME	: Caveolae-Mediated Endocytosis
CCK	: Cholécystokinine
ClfA	: Clumping factor A
CLR	: C-Like Receptor
CME	: Clathrin-Mediated Endocytosis
CMH	: Complexe Majeur d'Histocomptabilité
CMV	: CytoMegalovirus
CnBP	: Collagen Binding Protein
CoNS	: Coagulase Negative Staphylococci
CoPS	: Coagulase Positive Staphylococci
DSS	: Dextran Sodium Sulfate
Eap	: Extracellular adhesion protein
EEA1	: Early Endosome Antigene 1
EGFT	: Epithelial Growth Factor
ENO	: Enolase
EPEC	: EnteroPathogenic Escherichia Coli
FAK	: Focal Adhesion Kinase
FbpA	: Fibronectin binding protein A
FMT	: Fecal Microbiota Transplantation
FnBP	: Fibronectin Binding Protein
GALT	: Gut associated lymphoid tissue
GAPDH	: Glycéraldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GHIH	: Growth Hormone Inhbiting Hormone
GIP	: Gastric Inhibitory Polypeptide
GLP1	: Glucagon-like Peptide 1

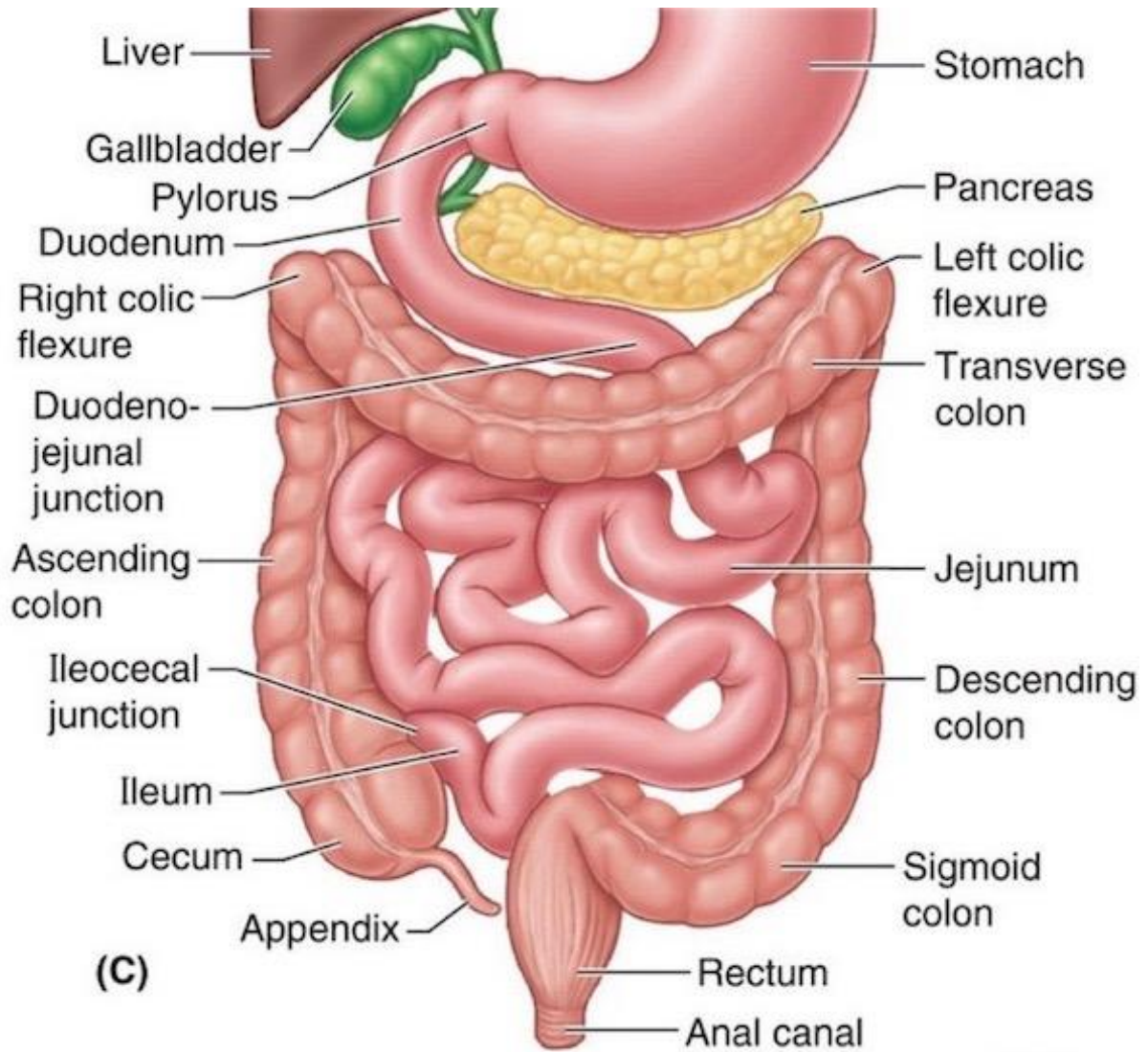
GLP2	: Glucagon-like Peptide 2
HIO	: Human Intestinal Organoid
Hsp	: Heat Shock protein
IFN $\beta$	: Interféron $\beta$
IgA	: Immunoglobulines de type A
IL	: Interleukine 10, 8, 1 $\beta$ , 18, 22, 25
Inl	: Internalin
iPSC	: induced Pluripotent Stem Cells
JACOP	: Junction-Associated Coiled-Coil Protien
JAM	: Junctional Adhesion Molecules
LAMP	: Lysosomal-Assoiated Proteins
Lap	: Listeria adhesion, protein
LC3	: microtubule-associated protein Light Chain 3
LGP2	: Laboratory of Genetic and Physiology 2
Lgr 5	: Leucin-rich repeat-containing G protein-coupled recptor 5
LLO	: Lystériolysine O
Lpl	: Lipoprotein-like
LPSN	: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
LRR	: Leucine Riche Repeat
Lypd8	: LY6/PLAUR domain ocntaining 8
MAMP	: Microbe-Associated Molecular Patterns
MapA	: Mucus adhesion protein A
MAPK	: Mitogene-Activated Protein Kinase
MCP1	: Monocyte Chemoattractant Protein 1
MDA5	: Melanoma Differentiation Associated factor 5
MICI	: Maladies Inflammatoires Chronique de l'Intestin
MLC	: Myosin Light Chain
MLCK	: Myosin Light Chain Kinase
MRSA	: Methicilin Resistant Staphylococcus Aureus
MSCRAMM	: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MTX	: MeThotreXate
NFk $\beta$	: Nuclear Factor k B

NLR	: NOD-Like Receptor
NLRC	: NLR à domaine CARD
NLRP	: NLR à domaine PYD
NOD	: Nucleotide Oligomerization Domain
NOD	: Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2
NPY	: Neuropeptide Y
PAMP	: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PET	: PolyEthylène téréphtalate
pH	: potentiel Hydrogène
PI3K	: PhosphoInositol-3-Kinase
Plc	: Phospholipase
POMC	: Pro opiomélanocortine
PRR	: Pathogen Recognition Receptor
PSM	: Phenol Soluble Modulín
PVL	: Panton-Valentine Leukocidine
PYY	: Peptide YY
RIG	: Retinoic acid-Inducible Gene
RLR	: RIG-I-Like Receptor
RNS	: Reactive Nitrogenous Species
ROS	: Reactive Oxygen Species
SadA	: Staphylococcal aromatic amino acid decarboxylase
SCFA	: Small Chain Fatty-Acid
SdrD	: Serin aspartate repeat containing protein D
SE	: Staphylococcal Enterotoxin
SFB	: Segmented Filamentous Bacteria
SLAP	: S-Layer Adhesive Protein
SLR	: Sequestosome-Like Receptor
SPI1	: Salmonella Pathogenicity Island 1
SraP	: Serine-rich adhesin for Platelets
SRIF	: Somatotropin Release-Inhbiting Factor
T3SS	: Type 3 Secretion System
T6SS	: Type 6 Secretion System

TA : Trace Amines  
TEER : TranEpithelial Electric Resistance  
TGF : Tumor Growth Factor  
TLR : Toll-like Receptor  
TSST : Toxic Shock Syndrome Toxin  
vWbp : von Willenbrand factor binding protein  
WASH : Wiskott-Aldich syndrome protein and Scar Homologue  
WRC : WAVE regulation Complex  
ZO : *Zonula Occludens*

# Introduction





Copyright © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

**Figure 1** : Schéma du tractus digestif depuis l'estomac jusqu'au canal anal (Wolters Kluwer Health, 2014).

# I - L'environnement intestinal

## I.I Anatomie et physiologie de l'intestin

### I.I.1 Anatomie générale de l'intestin

Chez l'Homme, l'intestin constitue la partie finale du système digestif, située à la suite de l'estomac, juste après le sphincter pylorique, et finissant à l'anus (**Figure 1**). Il est le principal siège de l'absorption des nutriments et abrite la plus importante quantité et diversité de micro-organismes du corps humain.

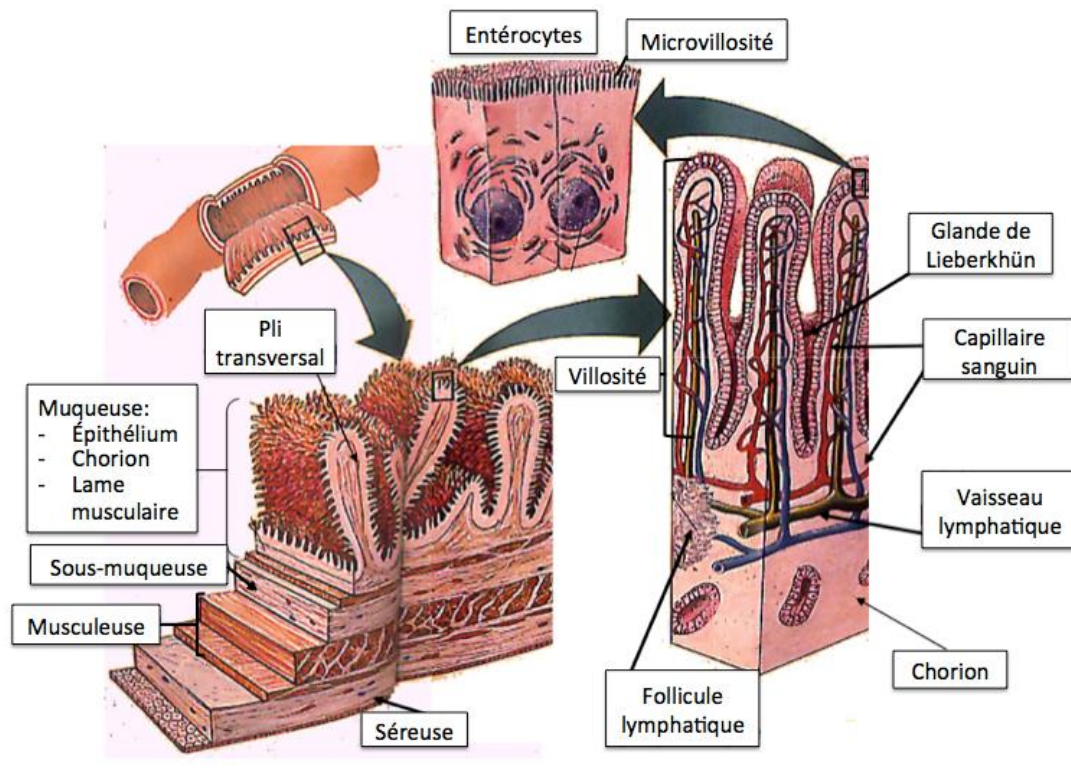
L'intestin est constitué de nombreux replis caractéristiques comme les plis circulaires et les villosités (**Figure 2**). Ceci a pour effet d'augmenter la surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur tout en limitant le volume occupé au sein de l'abdomen. La partie centrale de l'intestin, qui correspond donc au « milieu extérieur », est appelée *lumen* (ou lumière intestinale).

L'intestin se divise en deux sous parties, l'intestin grêle et le gros intestin, qui se distinguent par leurs caractéristiques histologiques et fonctionnelles.

L'intestin grêle est un canal de 2.5 cm de diamètre qui mesure environ 3 m de long. L'essentiel de l'assimilation des nutriments s'y déroule. Il est lui-même subdivisé en 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon (**Figure1**).

Le duodénum (du latin *duodenum*, signifiant « 12 » car sa longueur est d'environ 12 largeurs de doigt) est le segment le plus en amont et mesure environ 25 cm. C'est à ce niveau que débouchent les sécrétions pancréatiques et hépatiques pour participer à la digestion des aliments ayant traversés l'estomac (ou chyme).

Le jéjunum (du latin *jejunum*, signifiant « à jeun ») est la portion médiane de l'intestin grêle. Elle mesure environ 1 mètre et s'étend de l'angle duodéno-jéjunal de Treitz à l'iléon. Sa fonction principale est l'absorption des nutriments résultants de la digestion des aliments dans le duodénum.



**Figure 2 : Histologie de l'intestin grêle.** Au niveau de l'intestin grêle, la muqueuse est formée par un ensemble de trois « couches » : un épithélium, un chorion et une lame musculaire. L'épithélium, en contact avec le lumen, forme des structures évaginées, appelées « villosités », et des « cryptes » (également appelées Glandes de Lieberkühn). Il comporte un grand nombre de cellules spécialisées, dont les entérocytes, qui présentent des déformations de la membrane plasmique appelées microvillosités. Le chorion est la couche de tissus conjonctif en dessous de l'épithélium. Il contient des capillaires sanguins qui permettent de collecter les nutriments obtenus par l'épithélium et des follicules lymphatiques qui participent à la protection de l'organisme contre les pathogènes présents dans la lumière intestinale. Enfin la lame musculaire est une couche de cellules musculaires permettant la contraction du tissu et participant à la libération du contenu des glandes de l'épithélium. Au-dessous de la muqueuse, on retrouve la sous-muqueuse qui est une autre couche de tissu conjonctif, puis la musculeuse. La musculeuse est composée d'une couche de muscles lisses circulaires, impliqués dans les mouvements de segmentation du bol intestinal, et une couche de muscles lisses longitudinaux, impliqués dans l'avancée du bol alimentaire (péristaltisme). Pour finir, la séreuse forme la couche extérieure de l'organe (Tortora et Derickson, 4ème Edition).

L'iléon (du grec *eileîn*, signifiant « rouler ») constitue la partie terminale de l'intestin grêle. Il s'étend du jéjunum à la valve iléo-caecale. La séparation entre le jéjunum et l'iléon n'est pas nette d'un point de vue morphologique mais le diamètre de l'intestin grêle se réduit au niveau de l'iléon et l'on y observe des changements histologiques comparés au jéjunum. Les villosités du jéjunum sont notamment plus longues et les plaques de Peyer (organes lymphoïdes secondaires) plus abondantes comparé à l'iléon. Le rôle de l'iléon est essentiellement de finir l'absorption des nutriments après le jéjunum. C'est en particulier le lieu de l'absorption de la vitamine B12 (cobalamine) et des sels biliaires.

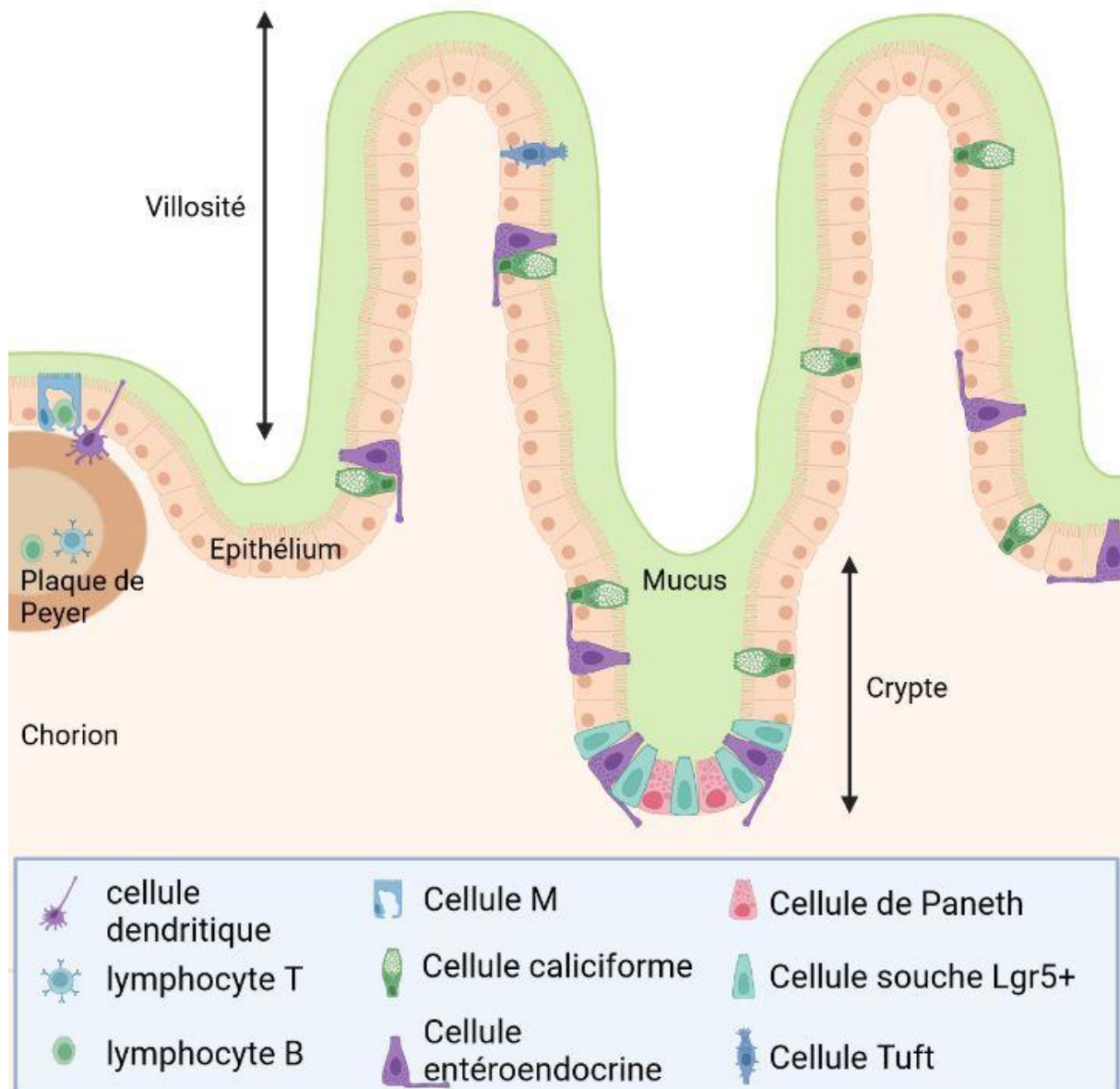
Le gros intestin commence avec le *cæcum* puis se poursuit avec le colon constitué des segments transversaux et longitudinaux pour aboutir au rectum (**Figure 1**). Comme son nom l'indique il est plus large que l'intestin grêle (environ 6 cm de diamètre) pour 1,5 m de long. Son rôle principal est l'absorption de l'eau et de certains métabolites essentiellement produits par le microbiote intestinal. Chez l'Homme, le colon est en effet la partie de l'organisme présentant la plus grande densité et la plus grande diversité de micro-organismes.

### I.I.2 Diversité tissulaire de l'intestin

L'intestin se compose de 4 couches de tissus : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (dans l'ordre à partir du *lumen*) (**Figure 2**).

La muqueuse se divise elle-même en 3 sous-couches : l'épithélium intestinal, le chorion (ou lamina propria ; tissu conjonctif) et la lame musculaire (ou *lamina muscularis mucosae* ; muscle lisse) (**Figure 2**).

L'épithélium intestinal est un épithélium de revêtement simple à cellules prismatiques qui possède des fonctions d'absorption et de sécrétion. Une couche de mucus recouvre sa surface, assurant une protection physique envers les micro-organismes et fluidifiant le transit du bol alimentaire. Sous l'épithélium, on trouve le chorion (ou *lamina propria*) qui joue un rôle de soutien physique des villosités grâce à la production de matrice extracellulaire, et un rôle dans l'irrigation sanguine des villosités. Ce chorion participe ainsi aux apports énergétiques et à la circulation des cellules immunitaires à proximité des cellules intestinales. Il peut également contenir des glandes sécrétrices, telles que les glandes de Brünner, impliquées dans la section duodénale, par exemple.



**Figure 3 : Diversité des types cellulaires de l'épithélium intestinal.** Les cellules souches LGR5+, nichées dans les cryptes, vont se différencier en l'un des types cellulaires de l'épithélium intestinal et vont migrer vers le pôle apical des villosités avant de se détacher (élimination des cellules). Seules les cellules de Paneth font exception, en migrant vers l'intérieur des cryptes. Les cellules M amènent les antigènes luminaux vers les plaques de Peyer, qui sont des follicules lymphatiques associés au tissu GALT et permettent une réaction immunitaire rapide. (Créé sur BioRender.com)

Les couches de tissus musculaires de l'intestin assurent les mouvements de segmentations (muscles circulaires) qui permettent le brassage du bol alimentaire, ainsi que le péristaltisme, qui permet l'avancer du bol alimentaire (muscles longitudinaux). La régulation de l'activité de ces couches musculaires est assurée par deux plexus majeurs (ensemble de neurones) : le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux. Le plexus myentérique (ou d'Auerbach) est situé entre la couche de muscles circulaire et la couche de muscles longitudinale. Il a essentiellement un rôle dans le péristaltisme et la segmentation. Le plexus sous-muqueux (ou de Meissner) est situé, comme son nom l'indique, dans la sous-muqueuse. Son rôle principal est la régulation de la sécrétion de certaines hormones comme la gastrine et la sécrétine. Ces deux plexus communiquent avec le nerf vague (nerf X) et participe ainsi à l'axe « microbiote-intestin-cerveau ».

### I.I.3 Diversité des types cellulaires de l'épithélium intestinal

Les caractéristiques fonctionnelles de la muqueuse intestinale sont liées aux différents types cellulaires composant l'épithélium intestinal (**Figure 3**) :

- Les entérocytes : ils assurent l'absorption des nutriments. Ils possèdent des déformations de la membrane plasmique, au niveau de leur pôle apical, appelées microvillosités. L'ensemble de ces microvillosités forme la « bordure en brosse ». De nombreuses enzymes spécifiques, notamment des hydrolases y sont exprimées.
- Les cellules entéro-endocrines : elles sécrètent des hormones ayant des rôles variés. Ces cellules peuvent notamment détecter certains des éléments présents dans la lumière intestinale et participer à la régulation de la balance énergétique de l'organisme. On dénombre au moins 7 populations de cellules entéro-endocrines dans l'intestin grêle et le gros intestin (Mace *et al.*, 2015) (**Tableau 1**) :
  - Les cellules entéro-endocrines D : elles sécrètent la Somatostatine (SRIF ou GHIH, pour Somatotropin Release-Inhibiting Factor ou Growth Hormone Inhibiting Hormone, respectivement). Elles régulent la sécrétion d'autres hormones intestinales et inhibent la vidange gastrique
  - Les cellules entéro-endocrines I : ces cellules sont essentiellement situées au niveau duodénal et sécrètent la cholécystokinine (CCK). Cette sécrétion est stimulée par la présence de lipides et/ou de protéines dans le lumen. La CCK

**Tableau 1 : Récepteurs, localisations, cibles et fonctions des hormones du système digestif**  
(Mace *et al.* 2015).

EEC	Hormone	GPCR(s) expressed	Location(s)	Target	Physiological function(s)
A	Ghrelin	T1R1 + T1R3, T2Rs	Stomach		Appetite control, food intake, growth hormone release
D	Somatostatin	GPBAR1, GPRC6A	Stomach, small intestine		Gastrin release (stomach)
G	Gastrin	LPAR5, GPRC6A	Stomach (pyloric antral)	Neuroendocrine cells of the gastric gland (enterochromaffin-like cells, parietal cells)	Gastric acid secretion, mucus growth; gastric contraction
I	CCK	T2Rs, FFA1, GPR120, GPBAR-1, CaSR	Proximal small intestine	Gall bladder, pancreas, gastric smooth muscle	Gallbladder contraction, inhibits stomach emptying, pancreatic enzyme secretion and food intake, stimulates pancreatic enzyme and HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> secretion
K	GIP	GPR119, GPR120, GPR40	Proximal small intestine	Pancreatic $\beta$ -cells	Insulin release, gastric acid secretion, LPL activity in adipose
L	GLP-1, GLP-2, PYY, oxyntomodulin	T2Rs, T1R2 + T1R3, GPR40, GPR41, GPR43, GPR119, GPBAR-1, GPR120, CaSR, GPRC6A, SSTR5	Distal small intestine, colon	Endocrine pancreas	Nutrient uptake, intestinal motility, appetite regulation, insulin release, inhibits glucagon release, slows gastric emptying
M	Motilin	GPBAR-1	Small intestine	Smooth muscle of stomach and duodenum	Regulation of migrating myoelectric complex in pig, dog and human, gut motility
N	Neurotensin	GPR40, GPR41, GPR43, GPR120	Small (distal) and large intestine		Gastric acid secretion, biliary secretion, intestinal mucosal growth, intestinal peristalsis
P	Leptin	Nutrient receptors	Stomach		Appetite regulation; food intake
S	Secretin	Potential acid receptor	Proximal small intestine	Pancreas, stomach	Bicarbonate release, gastric acid secretion, colonic contraction, motility, pancreatic growth

stimule à son tour la sécrétion d'enzyme pancréatique et inhibe la vidange gastrique. Elle a d'autre part un effet anorexigène.

- Les cellules entéro-endocrine K : situées au niveau duodéal, elles sécrètent le « peptide insulino-trope dépendant du glucose » (GIP, pour Gastric Inhibitory Polypeptide). La sécrétion de cette hormone est principalement induite par le glucose (mais aussi par les protéines et les acides gras) et va potentialiser la sécrétion d'insuline, stimuler la sécrétion d'acide dans l'estomac et favoriser la lipolyse.
- Les cellules entéro-endocrines L : situées dans l'intestin grêle et le gros intestin, elles sécrètent plusieurs hormones comme le GLP1 (Glucagon-like Peptide 1), GLP2 (Glucagon-like Peptide 2) et le PYY (Peptide YY). Le GLP1 et le GLP2 stimulent la sécrétion d'insuline, inhibent la sécrétion de glucagon et la vidange gastrique. Le PYY va inhiber la motilité gastrique et augmenter la réabsorption des électrolytes et de l'eau dans le colon. Il va en plus activer les neurones du noyau arqué à POMC, la sécrétion de POMC ayant une action anorexigène (freine la prise alimentaire), et inhiber les neurones à NPY, le NPY ayant une action orexigène (favorise la prise alimentaire). L'ensemble des hormones GLP1, 2 et PYY a donc un effet anorexigène
- Les cellules entéro-endocrine M : situées au niveau du duodénum et du jéjunum, elle secrète la motiline. Cette hormone régule la motilité intestinale en favorisant l'avancée du bol alimentaire lorsque le pH est élevé, et en l'inhibant dans le cas d'un pH faible.
- Les cellules entéro-endocrines N : situées dans l'intestin grêle et le gros intestin, elles sécrètent la neurotensine. La neurotensine a des fonctions variées. Elle est sécrétée en réponse à la présence de lipides et/ou de glucose dans le bol alimentaire et va stimuler la sécrétion d'autres enzymes intestinales.
- Les cellules entéro-endocrine S : Situées au niveau du duodénum et du jéjunum, elles produisent la sécrétine en réponse à l'acidité du bol alimentaire qui entraîne le relargage d'ions bicarbonate afin de neutraliser le contenu intestinal.





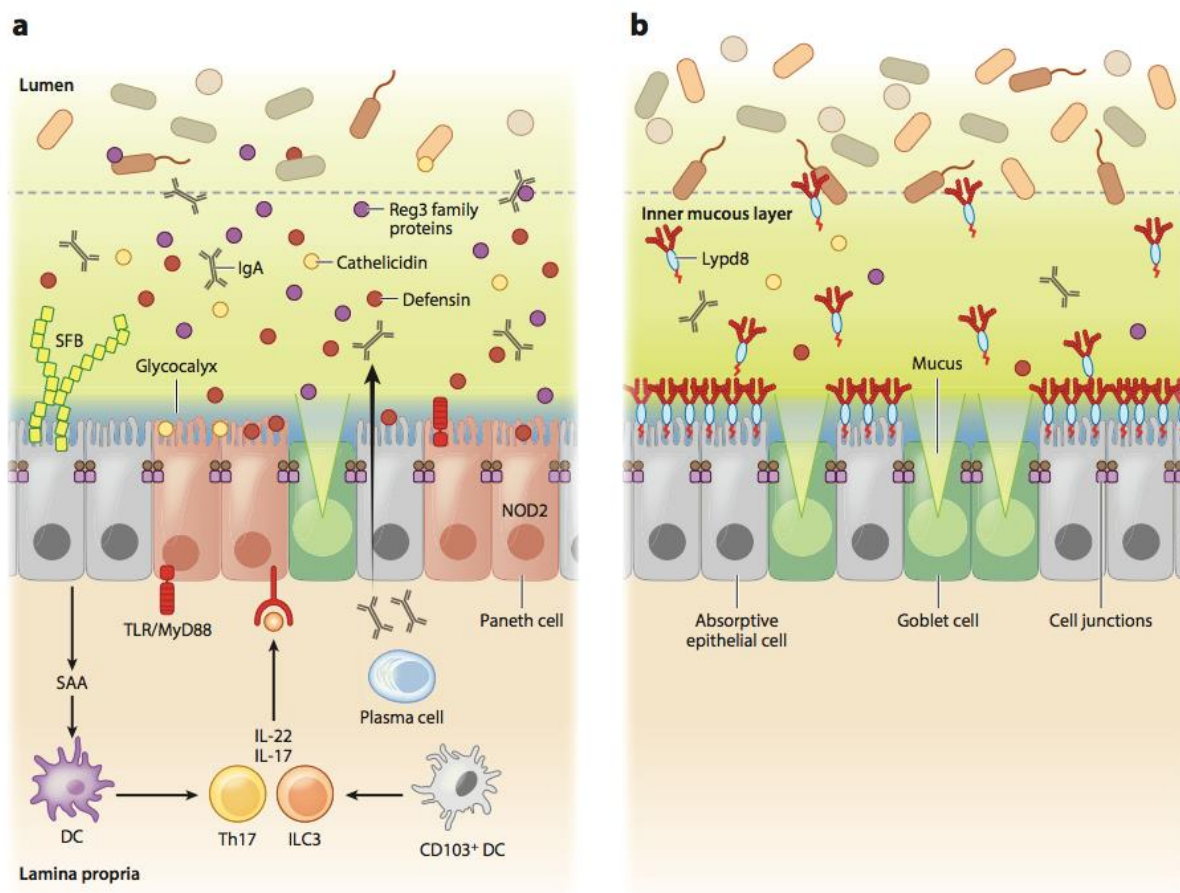
- Les cellules caliciformes : elles secrètent le mucus. Elles sont dites « à pôle muqueux ouvert » car la membrane plasmique au niveau du point de libération du mucus est difficilement visible.
  
- Les cellules M (pour « Microfold cell ») : elles appartiennent au tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT, Gut-Associated Lymphoid Tissue). Ce tissu regroupe de nombreux composants du système immunitaire. Les plaques de Peyer, par exemple, sont des structures du tissu GALT, localisées dans le chorion, où se concentrent des lymphocytes B et T. Les cellules M tapissent l'épithélium juste au-dessus de ces plaques de Peyer et possèdent la capacité de capter les antigènes présents dans le *lumen* pour les présenter aux cellules immunitaires sous-jacentes. Elles ont ainsi une fonction de vigie vis-à-vis des pathogènes potentiellement présents dans la lumière intestinale. Lorsqu'un antigène luminal se fixe sur un des récepteurs du pôle apical de la cellule, celui-ci est internalisé puis exocyté du côté basal. C'est ce que l'on nomme la transcytose. Ce mécanisme permet d'enclencher une réponse immunitaire médiée par les effecteurs présents dans le tissu GALT et, potentiellement, la production d'anticorps adaptés aux pathogènes détectés dans le lumen (Kobayashi *et al.*, 2019). Il est cependant à noter que cette capacité d'internalisation peut être exploitée par des bactéries pour franchir la barrière intestinale. Dans certaines conditions inflammatoires, telle que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), la proportion de cellules M est augmentée, provoquant ainsi une augmentation du nombre d'antigènes bactériens (ou de bactéries) franchissant la barrière intestinale, ce qui participe au maintien de l'inflammation sur le long terme.
  
- Les cellules de Paneth : Ces cellules, dont le rôle principal est la sécrétion de molécules microbicides, sont situées dans les cryptes intestinales. Ces cryptes correspondent à des invaginations de l'épithélium à la base des villosités (**Figure 3**). Contrairement aux autres types cellulaires, les cellules de Paneth restent dans les cryptes et ne migrent pas vers le sommet des villosités au cours du temps. Elles vont au contraire migrer vers le fond des cryptes. La durée de vie de ces cellules est d'environ 1 mois (contre quelques jours pour les autres cellules épithéliales) (Lueschow *et al.*, 2020). Les cellules de Paneth possèdent des granules contenant un grand nombre de composés. Certains sont directement synthétisés par la cellule



de Paneth (défensines, cathélicidines et lysozyme) alors que d'autres, comme les IgA (Immunoglobulines de type A), sont « fournis » d'autres types cellulaires. Ces composés, une fois sécrétés, s'accumulent dans le mucus et protègent l'épithélium intestinal contre les micro-organismes du *lumen*. Les cellules de Paneth jouent, de plus, un rôle important dans le renouvellement de l'épithélium en sécrétant une quantité importante de facteurs de croissance qui régulent la différenciation des cellules souches.

- Les cellules Tuft : bien qu'identifiées comme un type cellulaire distinct il y a plus de 60 ans sur la base de la morphologie de leurs microvillosités (Rhodin *et al.*, 1956), ces cellules sont restées bien moins étudiées, notamment à cause de l'absence de marqueurs moléculaires spécifiques et aussi de leur faible fréquence (0.5% des cellules de l'épithélium intestinal chez la souris). Au début des années 2010, il a été montré que les cellules tuft jouent un rôle dans la réponse immunitaire en sécrétant de l'IL-25 (Interleukine-25) qui va induire une réponse immunitaire polarisée (de « Type T<sub>H</sub>2 ») (Molke *et al.*, 2016 ; Jay, 2021).
- Les cellules souches intestinales : situées à la base des cryptes, elles participent au renouvellement de l'épithélium intestinal. Elles peuvent se différencier en l'ensemble des types cellulaires présentés précédemment. Chez l'Homme, on estime que l'épithélium intestinal se renouvelle complètement tous les 7 à 9 jours (les entérocytes différenciés ayant une durée de vie d'environ 3 à 5 jours). Les nouvelles cellules générées au niveau des cryptes migrent progressivement le long des villosités intestinales en « poussant » les cellules déjà différenciées vers le sommet. Les cellules souches intestinales expriment un récepteur spécifique nommé Lgr5 (pour Leucin-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5). La différenciation des nouvelles cellules formées se fait en réponse à des signaux émis par les autres cellules de l'épithélium, notamment les cellules de Paneth (Kurokawa *et al.*, 2020).

L'ensemble de ces cellules reposent sur la membrane basale. Celle-ci est une structure de matrice extracellulaire qui sert de séparation entre les cellules épithéliales et le tissu conjonctif sous-jacent.



**Figure 4 : Molécules impliquées dans la barrière intestinale.** La barrière intestinale est constituée d'une part par des cellules épithéliales, liées entre elles par des jonctions serrées (barrière physique) et d'autre part par la couche de mucus contenant diverses molécules anti-microbiennes (barrière chimique). a) Dans l'intestin grêle les cellules de Paneth et les cellules immunitaires du tissu GALT libèrent des molécules anti-microbiennes comme les cathelicidines, les defensines (protéines de la famille Reg3) ou encore des IgA au sein de la couche de mucus sécrété par les cellules caliciformes. b) Dans le côlon, l'absence de cellules de Paneth explique la quantité moindre de peptides anti-microbiens. Cependant la couche inférieure de mucus est plus dense que dans l'intestin grêle et d'autres mécanismes limitent la pénétration des bactéries à l'intérieur de ce mucus (comme la sécrétion de Lypd8 qui fixe les flagelles bactériens et inhibe leur mobilité) (Kayama *et al.*, 2020).

L'épithélium du colon est relativement semblable à celui de l'intestin grêle, à quelques différences notables :

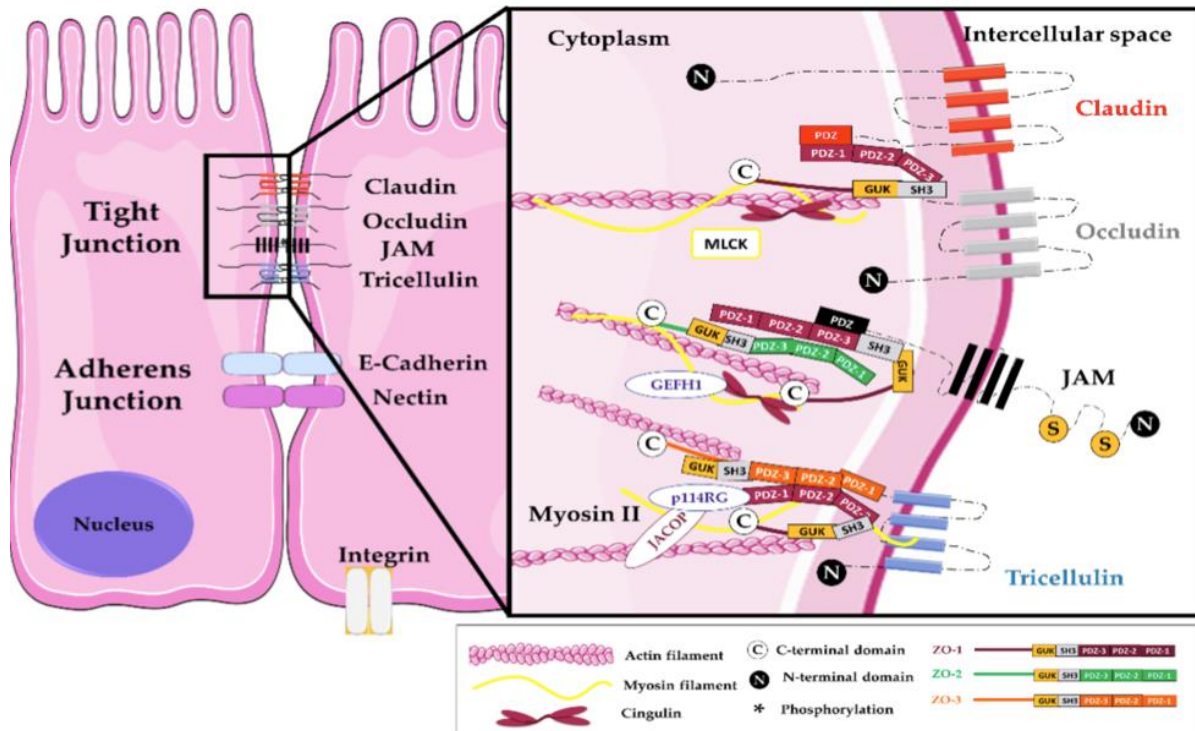
- Les entérocytes sont moins nombreux.
- Les cellules caliciformes sont plus abondantes (et la couche de mucus est plus épaisse).
- Il y a peu de cellules neuro-endocrines, comparé à l'intestin grêle.
- L'épithélium ne forme pas de villosités marquées.
- Il y a peu de cellules de Paneth.

Cette différence de diversité de types cellulaire reflète les différences fonctionnelles entre ces deux parties de l'intestin : l'intestin grêle est le siège de l'essentiel de l'absorption des nutriments alors que le colon réabsorbe majoritairement l'eau du contenu intestinal. Le plus grand nombre de cellules caliciformes dans le colon permet la production d'une couche de mucus plus épaisse renforçant ainsi la barrière physique de cette portion de l'intestin contenant la plus forte concentration bactérienne du tube digestif. De même l'absence de cellule de Paneth favorise le développement des micro-organismes dans la lumière du colon. Le mucus permet enfin de faciliter l'avancée du bol alimentaire jusqu'au bout du tube digestif.

## I.II La barrière intestinale

L'épithélium intestinal constitue une séparation entre les tissus de l'organisme et le milieu extérieur (lumière intestinale). De ce fait il remplit le rôle de barrière pour protéger l'organisme d'éventuelles bactéries pathogènes. On peut distinguer deux grands éléments participant à ce rôle de barrière : une barrière physique, formée par les cellules épithéliales et les jonctions serrées et une barrière chimique constituée par le mucus et divers substances antimicrobiennes (**Figure 4**).

Il est également possible de considérer le système immunitaire associé à l'épithélium intestinal comme un troisième éléments de défense, faisant partie intégrante de la barrière intestinale. Lorsque des molécules ou des micro-organismes arrivent à passer entre les cellules de l'épithélium intestinal, on parle de passage paracellulaire.



**Figure 5 :** Composition des jonctions serrées (TJ, Tight Junctions) entre cellules de l'épithélium intestinal. Les protéines transmembranaires de type claudine, occludine, JAM (Junctional Adhesion Molecule) et tricelluline font partie des principales protéines impliquées dans l'établissement de ces jonctions. Elles sont rattachées au cytosquelette d'actine et aux microtubules via des adaptateurs protéiques notamment les protéines *zonula occludens* 1 à 3 (ZO1-3), les cingulines et les paracingulines (ou JACOP, Junction-Associated Coiled-Coil Protein). Situées en dessous des jonctions serrées, les jonctions d'adhésion participent au maintien de la barrière intestinale. Les principales protéines impliquées dans ces jonctions sont les E-Cadherines et la Nectine. Enfin les protéines de la famille des intégrines permettent l'ancrage des cellules épithéliales à la membrane basale (Paradis *et al.*, 2021).

### I.II.1 Barrière physique

Les cellules de l'épithélium intestinal sont reliées entre elles par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes.

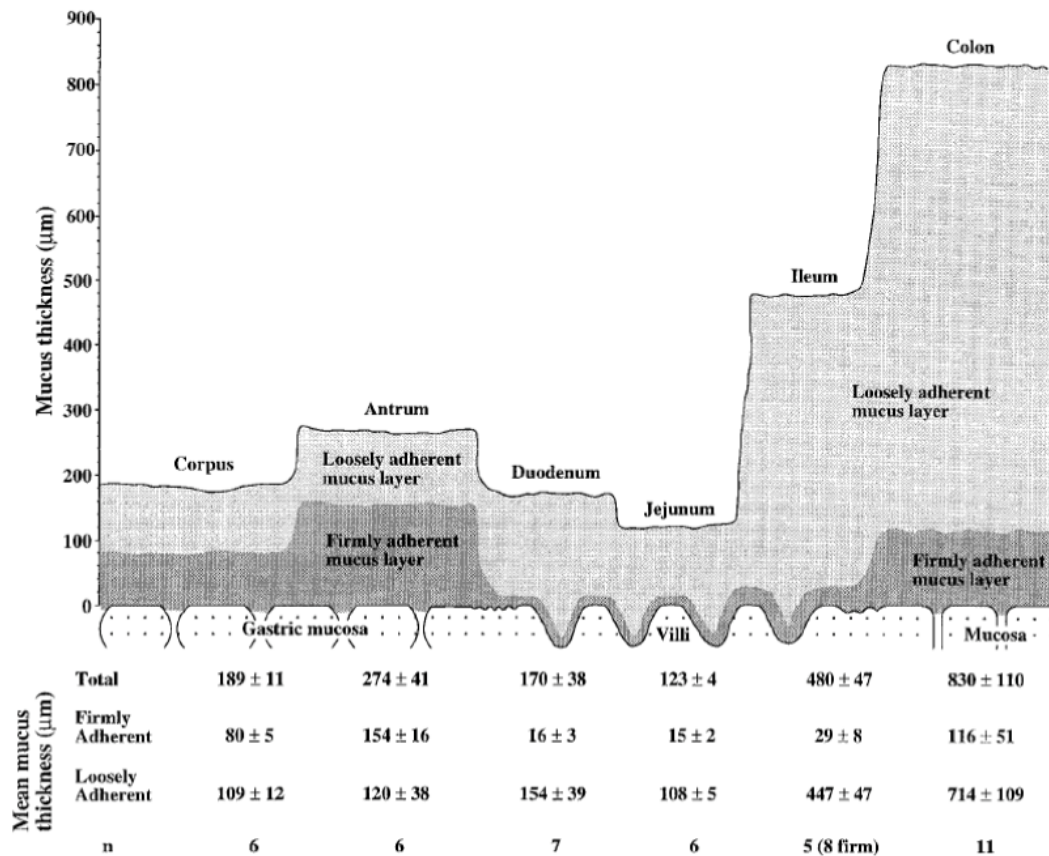
Les jonctions serrées sont les plus apicales et forment la barrière physique entre les cellules. L'intensité des interactions entre cellules épithéliales, déterminée notamment par la quantité de protéines impliquées dans les jonctions serrées, va déterminer la taille des molécules pouvant passer à travers l'épithélium. Les jonctions serrées sont assurées par différentes familles de protéines transmembranaires : les claudines, les protéines ayant un domaine Marvel (occludines, tricellulines et MarvelD3) et les protéines JAMs (Junctional Adhesion Molecules) et CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor proteins) (Paradis *et al.*, 2021). Ces protéines sont liées au cytosquelette d'actine et aux microtubules via des protéines adaptatrices dont les principales sont les protéines *zonula occludens* 1 à 3 (ZO1-3), les cingulines, les paracingulines ou encore les afadines (**Figure 5**). L'expression de ces protéines est influencée par plusieurs facteurs comme la composition du bol alimentaire, l'état inflammatoire et le microbiote.

Les jonctions adhérentes sont de deux types : les jonctions formant la *zonula adherens* (ceinture d'adhérence) qui sont liées aux filaments d'actines, et les desmosomes, qui sont liées aux filaments intermédiaires.

La *zonula adherens* est cruciale pour le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Elle est constituée par l'ensemble des molécules d'adhésion situées sur les parties latérales des cellules de l'épithélium intestinal. Parmi plus de 50 protéines différentes, les E-cadhérines et les intégrines ont une importance majeure dans ces structures (Ross et Pawlina, 2016).

Les E-cadhérines sont une famille de protéines transmembranaires dépendantes du  $Ca^{+}$ . Elles sont liées d'une part aux cadhérines des cellules voisines (par leur domaine extracellulaire) et d'autre part aux filaments d'actine, du côté intracellulaire, par l'intermédiaire de protéines de la famille des caténines. Les intégrines, quant à elles, sont des glycoprotéines transmembranaires constituées de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  qui forme les desmosomes reliant deux cellules adjacentes. Il existe 15 types de chaîne  $\alpha$  et 9 types de chaîne  $\beta$  et donc une grande diversité de combinaisons possibles, entraînant une grande diversité de ligands reconnus. En plus de pouvoir se lier aux intégrines des cellules adjacentes, les intégrines peuvent assurer la liaison à différentes molécules de la matrice extracellulaire telles que le collagène, la laminine, la fibronectine.





**Figure 6** : Évolution de l'épaisseur de la couche de mucus de l'estomac au colon (chez le rat). Après l'estomac (« corpus » et « antrum »), l'épaisseur des couches de mucus internes (dense) et externes (lâche) augmente jusqu'à être maximale dans le colon distal (Atuma *et al.*, 2001).

Du côté intracellulaire, les intégrines lient des filaments intermédiaires telle la kératine, des protéines comme la taline ou la vinculine, encore les filaments d'actines. Leur liaison aux protéines de la matrice extra-cellulaire constituant la membrane basale permet d'assurer l'attachement des cellules épithéliales à cette membrane.

### I.II.2 Barrière chimique

La couche de mucus sécrétée par l'épithélium intestinal est un rempart essentiel face aux micro-organismes (pathogènes mais également non pathogènes) de la lumière intestinale. La morphologie de la couche de mucus varie le long du tractus digestif : elle est formée d'une simple couche discontinue dans l'intestin grêle et de deux couches distinctes dans le côlon (Capaldo *et al.*, 2017). L'épaisseur totale de la couche croît au fur et à mesure que l'on progresse dans le côlon (**Figure 6**).

La première couche est formée de mucines (glycoprotéines) attachées au glycocalyx des cellules (glucides ancrés à la membrane plasmique). Ces mucines, et plus particulièrement la protéine MUC2 vont s'hydrater une fois sécrétées par les cellules caliciformes et former un gel.

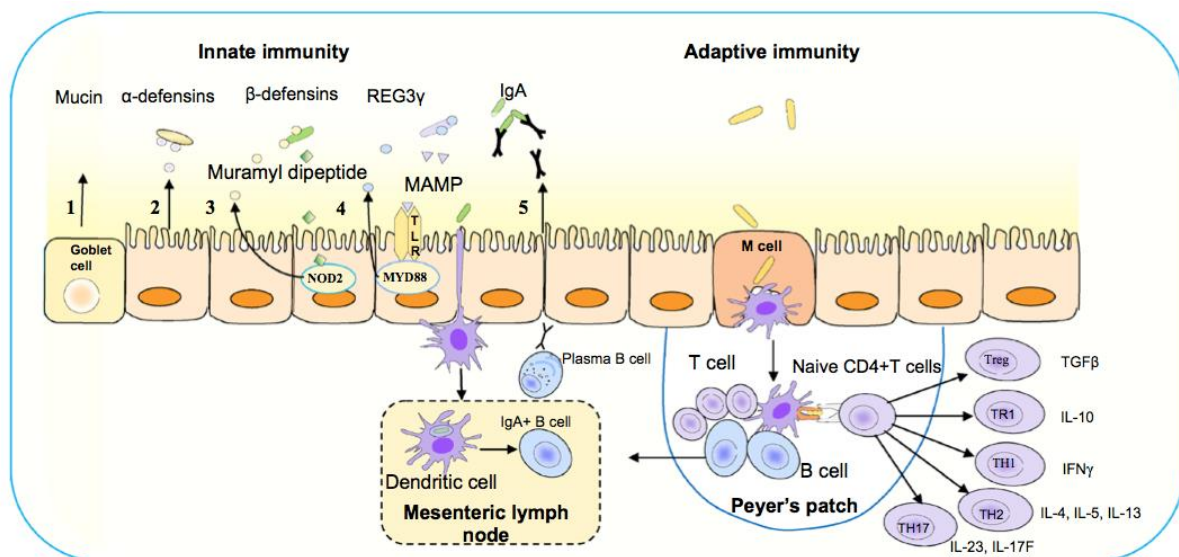
La deuxième couche du mucus est essentiellement formée par les résidus de protéolyse de la couche inférieure. Au sein du réseau de mucines, on retrouve un certain nombre de composés sécrétés par les cellules de Paneth comme des peptides antimicrobiens, du lysozyme ou des immunoglobulines (Gou *et al.*, 2022).

Dans le côlon, l'absence de cellule de Paneth entraîne une diminution de la concentration de ces molécules antimicrobiennes. En revanche, les entérocytes du colon sécrètent une protéine nommée Lypd8 (LY6/PLAUR domain containing 8) qui participe à la protection de l'épithélium en se fixant aux flagelles de bactéries du *lumen* et en inhibant leur déplacement (Hsu *et al.*, 2017).

Plusieurs facteurs influencent l'épaisseur de la couche de mucus. Les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou les MAMP (Microbe-Associated Molecular Patterns), en activant les récepteurs de type Toll (TLR pour Toll-like Receptors) et la voie de signalisation NFκB, vont entraîner une augmentation de l'expression et de la sécrétion de MUC2. Ceci a pour conséquence un épaissement de la couche de mucus et un renforcement de la barrière.

**Tableau 2 : Principaux facteurs influençant la production de mucus** (Paone et Cani, 2020).

EFFECTORS	EXTERNAL	INTERNAL	MUC2 EXPRESSION and SECRETION	OUTCOMES
Gut bacteria (PAMPs)	LPA LP LPS Flagellin	Activation of TLR-2, TLR-4, TLR-5 and the NFκ-B pathway	↗	↗ mucus production and barrier
Cytokines or Inflammatory markers	SAA3 IL-1β IL-4 IL-10 IL-13 IL-22 TNF- α	JAK/STAT NFκ-B pathway	↗	
	TNF- α	JNK pathway	↘	↘ mucus production and barrier
Hormones / Neurotransmitters	VIP	CREB and ATF1 via the MAPK and p38 pathway	↗	↗ mucus production and barrier
	Acetylcholine		↗	
Bioactive lipids	Bile acids (DCA)	FXR / NFκ-B pathway	↗	↗ mucus production and barrier
	PGE2	CREB and ATF1	↗	



**Figure 7 : La barrière épithéliale « immunitaire ».** 1) Sécrétion du mucus par les cellules caliciformes. 2) Expression constitutive de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales. 3) Sécrétion de β-defensine suite à l'activation de NOD2 en réponse à la reconnaissance de motifs de type « muramyl dipeptide » (dérivés du peptidoglycane bactérien). 4) Sécrétion de REG3γ, suite à l'activation de TLR par des MAMP. 5) Capture d'antigènes et/ou de bactéries du *lumen* par les cellules dendritiques migrant ensuite vers les plaques de Peyer. Les cellules dendritiques induisent la différenciation de lymphocytes B en plasmocytes sécrétant des IgA diffusant jusqu'à la couche de mucus. La capture d'antigènes et/ou de bactéries du *lumen* par les cellules M entraîne une polarisation variable des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et une sécrétion de cytokines spécifiques de l'antigène détecté (Adak et Khan, 2019).

De nombreuses cytokines, des neurotransmetteurs (tel que le peptide intestinal vasoactif ou l'acétylcholine) et les acides biliaires ont un effet similaire (Paone et Cani, 2020) (**Tableau 2**). Certaines bactéries intestinales, comme *Akkermansia muciniphila*, sont capables de proliférer au niveau de la couche extérieure de mucus en dégradant le mucus. Le renouvellement de la couche de mucus permet cependant de maintenir une épaisseur suffisante de mucines, malgré ces dégradations, et donc de ne pas mettre en péril la barrière intestinale

### I.II.3 Barrière immunitaire

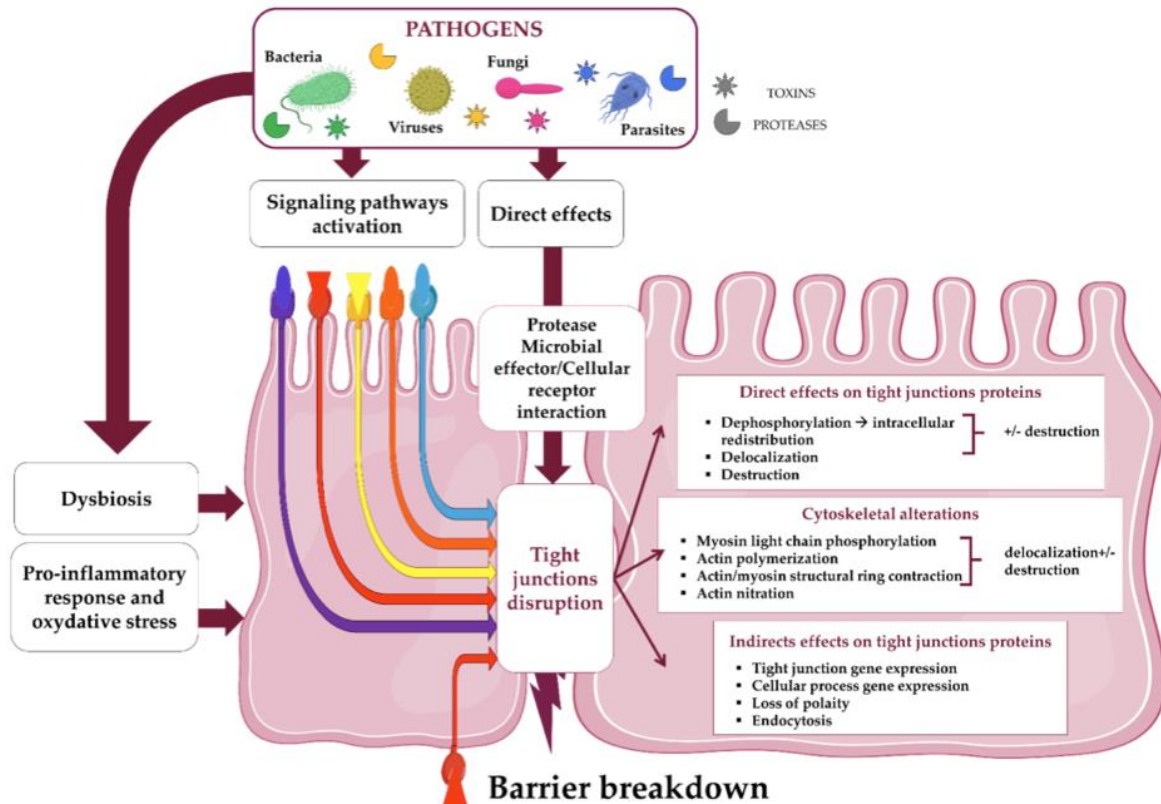
Les cellules du système immunitaire participent également à la barrière intestinale. La présence du tissu GALT, sous l'épithélium, permet une communication rapide entre le système immunitaire et les cellules de l'épithélium.

Les cellules M, en permettant la transcytose d'antigènes luminaux (ou de bactéries) présents dans la lumière intestinale permettent l'activation des cellules dendritiques résidentes des plaques de Peyer. Une fois activée, ces cellules dendritiques vont présenter leurs antigènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et induire leur polarisation en T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>, T<sub>RI</sub> ou T<sub>reg</sub> (en fonction du type d'antigène détecté).

Les lymphocytes T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> et T<sub>H17</sub> vont généralement sécréter des cytokines pro-inflammatoires, alors que les T<sub>reg</sub> et les T<sub>RI</sub> vont sécréter du TGF<sub>β</sub> (Tumor Growth Factor) et de l'IL-10, qui sont des cytokines considérées comme anti-inflammatoires. Cette activation des lymphocytes T peut également aboutir à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'IgA (Adak et Khan, 2019) (**Figure 7**).

Au niveau des villosités, les cellules M sont moins nombreuses et l'activation des cellules dendritiques vis à vis des pathogènes peut survenir d'une autre manière. Les cellules dendritiques sont en effet capables de former des extensions membranaires dites « paracellulaires » (passant entre les cellules épithéliales) et atteignant la lumière intestinale. Elles peuvent ainsi capter directement les antigènes intraluminaux.

D'autre part, les cellules calciformes semblent également capables de transporter des antigènes du *lumen* vers les cellules dendritiques sous-jacentes de l'épithélium. Enfin, les macrophages et les cellules dendritiques présents dans le tissu GALT peuvent former des extensions membranaires atteignant la lumière intestinale et capter ainsi directement les antigènes intraluminaux (Luciani *et al.*, 2022).



**Figure 8** : Perturbation des jonctions serrées par les pathogènes. Les pathogènes peuvent agir directement sur les protéines des jonctions serrées ou sur le cytosquelette lié à ces jonctions. Ils peuvent également moduler les gènes impliqués dans les jonctions cellulaires ou la modifier la physiologie cellulaire en induisant une perte de polarité ou l'endocytose des protéines de jonctions serrées (Paradis *et al.*, 2021).

#### I.II.4 Atteintes de la barrière intestinales par les bactéries

Plusieurs pathogènes ont développés des mécanismes pour franchir la barrière intestinale (**Figure 8**). L'un des moyens de franchir cette barrière est d'augmenter la perméabilité de l'épithélium intestinal. Cela peut passer par la dégradation des protéines des jonctions serrées évoquées précédemment (Paradis *et al.*, 2021).

Par exemple, *Clostridioides difficile* est une bactérie pathogène qui sécrète deux toxines, nommées A et B, induisant la dissociation des complexes ZO1-actine, la libération de l'occludine et ainsi l'affaiblissement des jonctions serrées. *Clostridium perfringens* sécrète elle une entérotoxine se liant à la claudine 4 et provoquant sont internalisation et sa dégradation.

Enfin, certains pathogènes vont agir sur les voies de signalisation associées aux jonctions serrées. Un exemple de ce type de stratégie est illustré par *Listeria monocytogenes* dont la protéine d'adhésion (Lap) est reconnue par le récepteur Hsp60 de la cellule épithéliale. Cette reconnaissance entraîne une activation de la voie NF- $\kappa$ B qui va augmenter la phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC) via les MLC kinases (MLCK), amenant à un relâchement des jonction serrées (Droliia *et al.*, 2018).

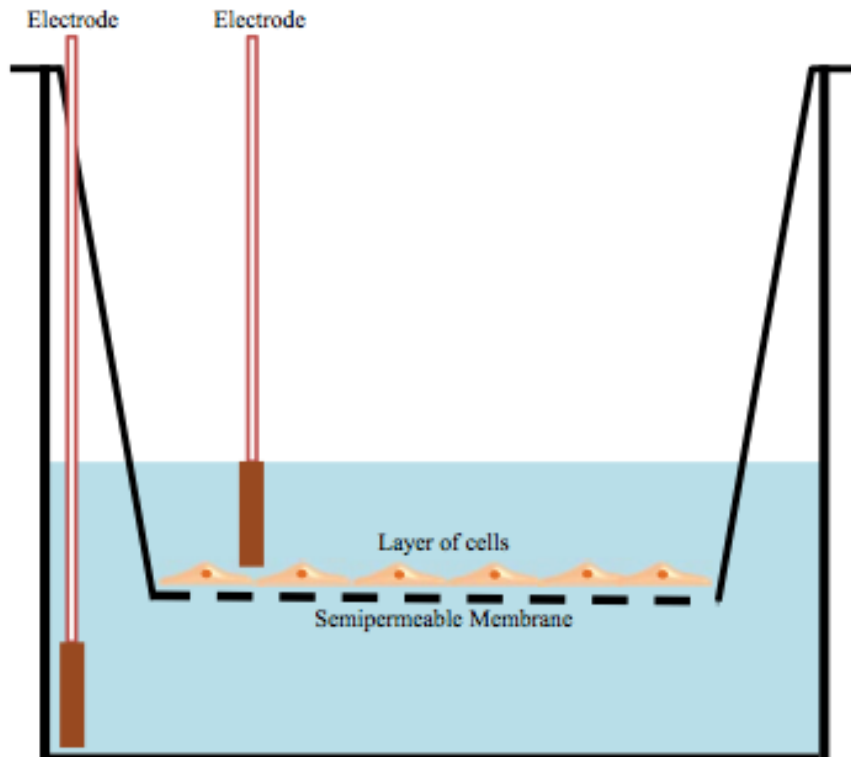
Un autre mécanisme majeur pour franchir la barrière intestinale utilisé par les pathogènes est d'emprunter une voie passant « à travers » les cellules (trans) plutôt qu'entre les cellules (para). Ce mécanisme sera décrit plus tard, dans la partie « Mécanismes d'internalisation de bactéries dans les cellules non-phagocytaires » (II.II.III).

### I.III Modèles intestinaux

L'étude de l'environnement intestinal se heurte, comme l'essentiel des études sur le vivant, à des questions pratiques et éthiques. Il est par conséquent nécessaire de posséder des modèles *in vitro* d'étude de la physiologie intestinale comme approches initiales pour tester nos hypothèses. Nous allons présenter ici différents modèles *in vitro* couramment utilisés pour étudier la physiologie intestinale et discuter de leurs limitations.

#### I.III.1 Lignées cellulaires

Les cultures primaires d'entérocytes ne forment pas d'épithélium polarisé, rendant ainsi nécessaire l'utilisation de lignées de cellules immortalisées (Panse et Gerck, 2022).



**Figure 9** : Schéma d'un dispositif Transwell®. Une membrane semi-perméable permet la culture et la différenciation de cellules intestinales dans le compartiment du haut (apical), tout permettant le passage de molécules vers le compartiment du bas (basal). L'utilisation d'électrodes permet de mesurer la résistance électrique formée par l'épithélium reconstitué (TEER), qui reflète la perméabilité de cette monocouche de cellules (Srinivasan *et al.*, 2014).

Il existe plusieurs lignées cellulaires reproduisant certaines des caractéristiques phénotypiques et/ou génotypiques des cellules intestinales décrites précédemment. Parmi les lignées les plus largement utilisées, on retrouve les cellules Caco2, HTB9 et T84.

La lignée Caco2 (Cancer Coli-2) dérive d'un adénocarcinome colique (Fogh *et al.*, 1977). C'est la lignée la plus utilisée pour les études *in-vitro* de l'épithélium intestinal. Elle a pour particularité de se différencier spontanément en cellule de type « entérocyte » lorsque la culture est à confluence. De manière intéressante, il est à noter qu'une fois différenciées, les cellules Caco2 présentent des caractéristiques plus proches des entérocytes situés au sein de l'intestin grêle malgré le fait que les cellules Caco2 proviennent originalement du côlon. Leurs caractéristiques restent cependant hybrides avec les colonocytes et dépendent grandement des conditions de cultures.

Les cultures réalisées *in vitro* sur des supports en plastique classiques ne permettent pas d'obtenir une polarisation complète des cellules Caco2 (différenciation d'un pôle apical et d'un pôle baso-latéral). Une différenciation complète de ces cellules nécessite une culture en système Transwell®, c'est à dire un filtre (généralement en polycarbonate, en polyester ou en polyéthylène téréphtalate (PET)) (**Figure 9**). Une fois différenciées, les cellules Caco2 forment une monocouche de cellules reliées entre elles par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes caractéristiques des entérocytes. La partie apicale des cellules possède des microvillosités et exprime des enzymes telle que la lactase, l'aminopeptidase N, la sucrase-isomaltase et la dipeptidylpeptidase IV, enzymes caractéristiques des entérocytes (Engle, 1998). L'utilisation des systèmes Transwell® permet de plus d'étudier la perméabilité de la couche de cellules différenciées. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour cela comme la mesure de la résistance électrique générée par l'épithélium reconstitué, aussi appelée TEER (TransEpithelial Electric Resistance), ou l'efficacité de diffusion de molécules fluorescentes à travers cet épithélium (comme la Lucifer Yellow ou le FITC-Dextran). Dans ce dernier cas il est crucial que la molécule ne soit pas absorbée par les cellules mais que son passage du compartiment apical au compartiment baso-latéral s'effectue par un passage paracellulaire et ne dépende ainsi que de l'intégrité et du nombre de jonctions serrées.

La lignée HT29 constitue une seconde lignée de cellule très utilisée pour l'étude de la physiologie intestinale *in vitro*. Contrairement à la lignée Caco-2, la lignée HT29 ne se différencie pas spontanément en un type cellulaire spécifique.





Il s'agit donc d'une lignée pluripotente précurseur de plusieurs type types cellulaires de l'épithélium intestinal. En ce qui concerne la différenciation en entérocytes, celle-ci s'obtient par la culture des HT29 dans un milieu sans glucose (le galactose étant alors utilisé en remplacement). On retrouve des microvillosités au pôle apical des HT29 et des jonctions serrées entre les cellules (Panse et Gerk, 2022). Les différences principales entre HT29 et Caco2 sont :

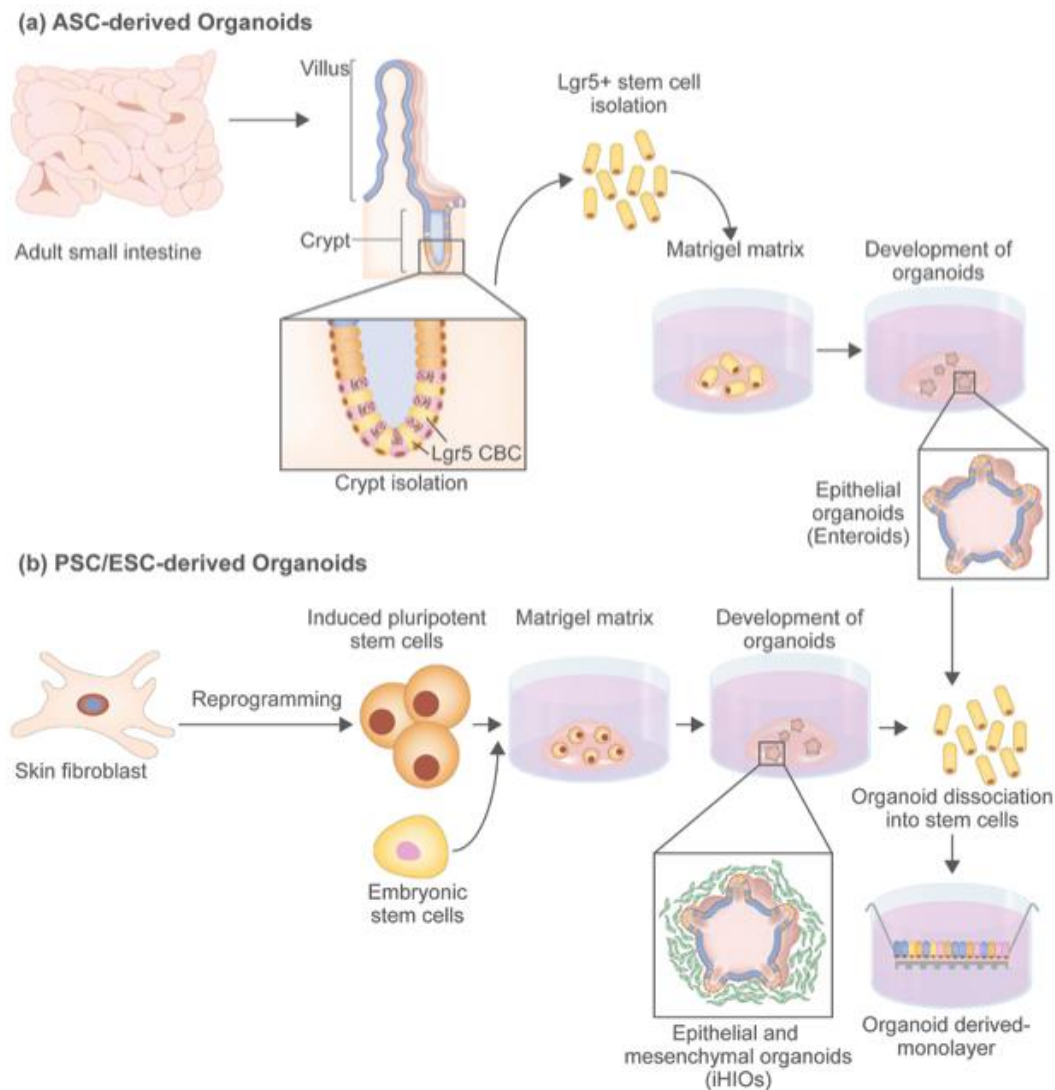
- \* un temps de différenciation plus long pour les HT29 (~30 jours contre ~20 pour les Caco2)
- \* une activité enzymatique moins importante au niveau du pôle apical (l'activité lactase étant absente et celle de la sucrose-isomaltase présente seulement dans environ 50% des cellules)
- \* la sécrétion de mucus (absente dans le cas des Caco2). Il existe en effet des lignées dérivées des HT29 (résistantes au methotrexate ou MTX) capables de sécréter du mucus (HT29-MTX) (Simon-Assmann *et al.*, 2007).

Les cellules de types T84 constituent le dernier type cellulaire fréquemment utilisé. Cette lignée provient d'une métastase d'un adénocarcinome colique isolée dans les voies respiratoires. Contrairement aux modèles précédents, les cellules T84 se rapprochent davantage des colonocytes que des entérocytes (Devriese *et al.*, 2017). Comparativement au Caco2, cela se traduit par des microvillosités plus courtes, et une activité enzymatique plus faible associée à ces villosités.

### I.III.2 Modèles de co-cultures

Comme nous l'avons vu, l'utilisation de lignées cellulaires *in vitro* dérivées de tumeurs souffre de nombreuses limites. Si les Caco2 possèdent des caractéristiques proches des entérocytes, il existe des différences phénotypiques avec ces derniers. De plus on ne saurait rendre compte de la complexité de l'environnement intestinal en ne considérant qu'un seul type cellulaire comme les entérocytes. Notamment, dans le cas d'études se focalisant sur l'adhésion ou l'invasion de l'épithélium intestinal par des micro-organismes pathogènes, l'absence de mucus ou de cellules immunitaires constitue un biais important.

Pour pallier ce problème, différents systèmes de co-culture existent. Le plus courant est l'utilisation de co-cultures de Caco 2 avec des HT29-MTX, afin d'obtenir un épithélium constitué de cellules de type entérocyte, tout en ayant une couche de mucus protectrice



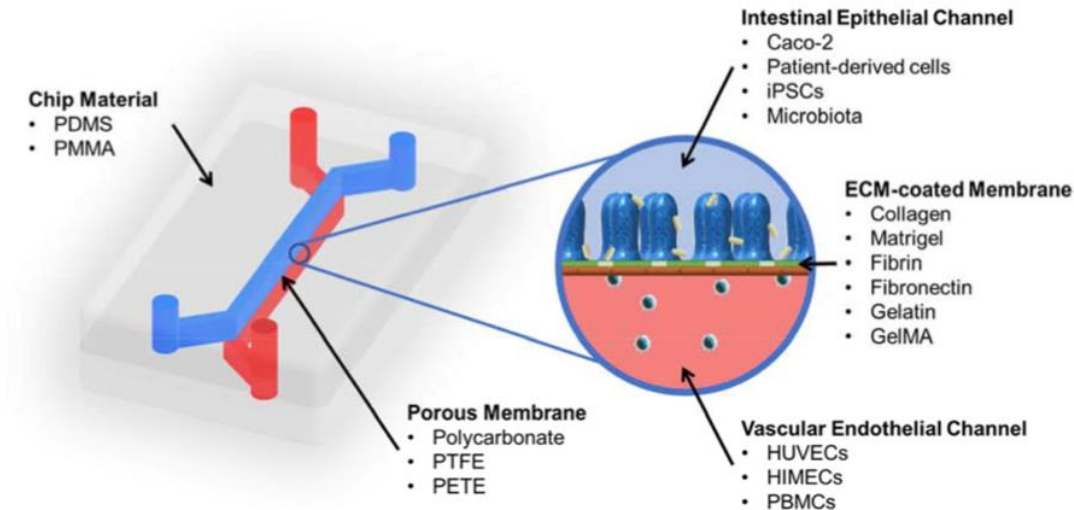
**Figure 10 : Schéma du procédé de développement des organoïdes.** A) En partant de cellules souches adultes de l'épithélium intestinal, on obtient un organoïde (aussi appelé enteroïde dans ce cas) contenant tous les types cellulaires de l'épithélium. En partant de cellules souches pluripotentes, on obtient un organoïde plus complexe, composé de diverses cellules épithéliales mais aussi mésenchymateuses (aussi appelé HIO pour Human Intestinal Organoid). L'organoïde peut être soit conservé dans sa configuration 3D soit dissocié pour passer à des systèmes de culture 2D (Rahmani *et al.*, 2019).

recouvrant leur surface apicale (Mahler, 2009). Certains systèmes plus complexes de co-culture de plus de 2 lignées cellulaires ont également ont été développés. Ainsi il existe des modèles de culture en Transwell® où des cellules Caco2 et HT29-MTX sont ensemencées dans le compartiment apical du système alors qu'en parallèle, des lymphocytes de lignée Raji B sont ensemencés dans le compartiment basal (Antunes *et al.*, 2013). Les cellules Raji B vont entraîner la différenciation de Caco 2 en cellules de type M, permettant ainsi d'avoir une composante immunitaire dans ce modèle *in vitro* (Lai et D'Souza, 2008). Le rôle des cellules M consistant à capter des antigènes présents dans le lumen (pôle apical) pour les amener dans les tissus sous-jacents de l'épithélium (pôle basal), ce modèle de co-culture est particulièrement adapté lorsque l'on s'intéresse à la perméabilité intestinale, au transport de molécules ou à la capacité de traversée de la barrière épithéliale par des pathogènes.

Ces modèles présentent également des limites. Il manque certains types cellulaires tels que les cellules entéro-endocrines. S'agissant d'une monocouche de cellules, les tissus sous-jacents (conjonctif, musculaire) et les structures particulières associées qu'on l'y retrouve (plaques de Peyer, ganglion de Meissner et Auerbach) sont absents. Il s'agit également d'un modèle « statique » alors que l'épithélium intestinal est naturellement soumis au mouvement dus au péristaltisme et à la segmentation.

### I.III.3 Les organoïdes

Au cours de ces 10 dernières années, le développement d'organoïdes a laissé entrevoir la possibilité de travailler *in vitro* sur un microenvironnement intestinal plus complet et représentatif de la réalité physiologique que tout ce que permettait la culture *in vitro* en plaque jusqu'ici. En effet, l'idée est ici de partir de cellules souches intestinales et de les différencier pour obtenir une diversité de types cellulaires proche de celle observée *in vivo*. Les organoïdes de l'intestin dérivent soit de cellule souches adultes (ASC, Adult Stem Cells) Lgr5<sup>+</sup>, situées normalement au fond des cryptes intestinales, soit de cellules souches pluripotentes dérivées de cellules embryonnaires, soit de cellules souches pluripotentes induites (iPSC pour induced Pluripotent Stem Cells) (Rahmani *et al.*, 2019) (**Figure 10**). Les organoïdes dérivant d'ASC sont cultivés dans une matrice gélatineuse (Matrigel®) contenant différents composants de matrice extracellulaire comme de la laminine ou du collagène. Ceci permet le développement de tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal et l'assemblage d'une structure 3D proche de leur organisation *in vivo*. Les organoïdes dérivant de cellules souches pluripotentes,



**Figure 11** : Caractéristiques des systèmes Gut-on-Chip. Ce type de modèle permet de reproduire l’interface épithélium intestinal/vaisseaux sanguins et les mouvements de déformations subies *in vivo* par ces tissus. Les cellules intestinales cultivées dans ce type de modèle adoptent spontanément une structure reproduisant les villosités intestinales (Ashammakhi *et al.*, 2020).

**Tableau 3** : Comparaison de différents modèles de culture *in vitro* (Puschhof et al 2021)

Model comparison		ASC organoids	ASC chips	PSC organoids	2D organoids	Cell line chips	2D cell lines	Explants
<b>Features</b>	Oxygen gradient (endogenous)	++	-	++	-	-	-	-
	Oxygen gradient (engineered)	-	+++	-	++	+++	++*	-
	Co-culture duration	++	+++	+	++	+++	-	-
	Flow & Peristalsis	-	+++	-	+	+++	+	-
	Cell type representation	+++	++	++	++*	-	-	+++
	Regional identity	+++	++	+	+++*	-	-	+++
<b>Processes</b>	Mutagenesis	+++	++*	+	+	+	+	-
	Epithelial turnover	+++	++	++	++	+	+	-
	Intestinal cell fate	+++	++	++	+	-	-	-
	Epigenetics	+++	+++*	++	+++*	+	+	-
	Epithelial damage & Barrier integrity	++	+++	++	+++	+++	+	+
	Pattern recognition & Inflammation	+++	+++	+++	+++	+	+	+++
	Adhesion & Invasion	++	+++	+++	+++	+	+	+++
	Pathogen replication & Life cycle	+++	+++	+++	+++	+	+	+
<b>Perspectives</b>	Inclusion of microenvironment	++	+++	+++	++	+++	++	+++
	Complex architecture	++	+++	++	-	+	-	+++
	Microbial community dynamics	+	+++	+	+	++	+	+
	Drug screens	++	++	++	+	+	+	+

Adult stem-cell (ASC)-, pluripotent stem-cell (PSC)-derived organoid, and chip models are compared with monolayer cultures and organotypic explants. \*platform potential, which remains to be demonstrated.

eux, ne sont pas limités aux cellules épithéliales et peuvent également donner des cellules mésenchymateuses. Les cultures obtenues peuvent aussi être établies sur plaque pour avoir un développement 2D, ce qui offre un accès plus aisé à la partie apicale. En effet, dans un modèle 3D d'organoïde, la partie apicale est située au centre et l'ajout de composés côté « apical » nécessite de réaliser des micro-injections (Puschof *et al.*, 2021). Comme alternative, Il existe également des modèles développés en « apical-out » où la face apicale des cellules fait face à l'extérieur de l'organoïde. Les études sur les organoïdes « apical-out » humains sont cependant encore peu nombreuses (Csukovich *et al.*, 2022), (Co *et al.*, 2019). Les organoïdes peuvent être des outils précieux pour étudier les mécanismes de développement et de différenciation de l'épithélium intestinal. La richesse des organoïdes peut cependant poser un problème : il existe en effet une grande hétérogénéité associée à ce modèle et donc une faible reproductibilité. Beaucoup de laboratoire utilisent notamment leur propre « recette » pour développer les organoïdes. A cela s'ajoute que le Matrigel<sup>®</sup>, couramment utilisé, est un milieu complexe non standardisé, avec de fortes disparités de composition entre les lots. Plusieurs travaux récents ont été effectués pour tenter de standardiser le développement des organoïdes et de trouver des alternatives à l'utilisation du Matrigel<sup>®</sup> afin d'augmenter la reproductibilité de cette technique (Kozłowski *et al.*, 2021).

#### I.III.4 Organ-on-Chip

Les technologies de type « organ-on-chip » permettent de pallier le manque de dynamisme des modèle précédents. Ces techniques reposent sur l'utilisation de "puces" composées de compartiments dans lesquels sont cultivées les cellules. Ces compartiments ont la possibilité de se déformer de façon à mimer les propriétés mécaniques des tissus modélisés (**Figure 11**). Les systèmes « Gut-on-chip » (Emulate) permettent la culture, dans 2 compartiments juxtaposés, d'une part de cellules épithéliales intestinales et d'autre part cellules endothéliales. Ces systèmes permettent ainsi de mimer l'interface épithélium intestinal/vaisseau sanguin. A cela s'ajoute la capacité de déformer les compartiments de façon à reproduire le flux de liquide dans la lumière intestinale, le péristaltisme et les mouvements de segmentations de l'intestin (Shim *et al.*, 2017). Enfin, il est possible de contrôler les niveau d'O<sub>2</sub> dans les compartiments ce qui est un paramètre essentiel dans le cas de l'étude de l'environnement intestinal. Ces modèles constituent des outils très intéressants pour l'étude des interactions du microbiote avec les cellules intestinales (Ashammakhi *et al.*, 2020) (**Tableau 3**).



### I.III.5 L'*ex vivo* et l'*in vivo*

Le travail à partir d'organes prélevés sur des animaux (*ex vivo*) ou sur l'animal vivant (*in vivo*) constituent une alternative aux modèles *in vitro* décrits précédemment pour analyser la physiologie intestinale de façon plus intégrée. Une limitation majeure avec ces modèles (en plus des problèmes éthiques liés à l'utilisation d'animaux à des fins de recherche) est l'utilisation d'espèces animales différentes de l'Homme, comme la souris ou le rat. Il existe des différences majeures tant au niveau anatomique que physiologique entre ces modèles animaux et l'Homme. Dans le cas de l'étude du microbiote, par exemple, la partie la plus riche en micro-organismes chez la souris est située dans le *cæcum*, qui est une structure très développée et bien individualisée du côlon. Chez l'Homme, au contraire, le *cæcum* est pratiquement inexistant et la plus grande quantité des micro-organismes du microbiote se situe dans le côlon.

Par rapport aux modèles *in vitro*, les modèles *ex vivo* permettent de travailler sur un organe possédant l'ensemble des types cellulaires d'intérêt et la structure tridimensionnelle associée. Dans la plupart des cas cependant, les relations entre les différents organes sont perdues, notamment l'apport du système nerveux par le biais de l'innervation. Toutefois, des travaux visent à élaborer des systèmes où différents organes sont prélevés *ex vivo* puis mis en relation via des systèmes mécaniques afin de recréer les connexions existantes normalement *in vivo* (Yissachar *et al.*, 2017).

## I.IV Le microbiote intestinal

L'être humain est aujourd'hui considéré comme un « holobionte », c'est à dire qu'il n'est plus considéré comme un organisme constitué uniquement de cellules eucaryotes, ni d'un organisme eucaryote hébergeant un certain nombre de micro-organismes mais comme un écosystème composé à la fois de cellules eucaryotes et de micro-organismes interagissant étroitement (Gilbert *et al.*, 2012). Le corps humain est constitué de plusieurs « niches écologiques » abritant chacune un ensemble de micro-organismes spécifique nommé microbiote. Le terme « microbiome » est parfois utilisé dans la littérature. Alors que le terme « microbiote » désigne l'ensemble des micro-organismes observé dans un environnement donné, le terme « microbiome » désigne en général l'ensemble des génomes de ces micro-organismes (Salazar *et al.*, 2020). Il existe des différences de composition du microbiote en fonction des différentes localisations anatomiques de l'être humain. On peut ainsi distinguer le microbiote cutané, le microbiote urogénital ou le microbiote intestinal, par exemple.





Le microbiote intestinal, de par sa richesse, sa diversité et ses capacités d'interaction avec le système nerveux central, a été particulièrement étudié au cours de ces 10 dernières années. L'environnement intestinal est un environnement anoxique et à pH variable en fonction du segment considéré. Le pH varie de 6 au niveau duodénal pour monter jusqu'à 7,4 dans l'iléon avant de rechuter à 5,7 au niveau du cæcum pour remonter enfin et atteindre 6,7 au niveau rectal. (Fallingborg, 1990). Ces variations physico-chimiques de l'environnement intestinal conditionnent la nature des micro-organismes qui y résident.

### I.IV.1 Composition

Grâce au progrès des techniques de séquençage, l'étude du microbiote intestinal a fortement progressée. Il se compose d'Archées, de champignons, de virus et de bactéries, ces dernières constituant la majorité des micro-organismes du microbiote intestinal. La majorité des études ne s'attache qu'à l'étude de cette composante

#### Mise en place du microbiote intestinal

La colonisation post-partum du tube digestif des nouveaux-nés, survenant au moment de l'accouchement, reste le mécanisme considéré comme prépondérant chez l'Homme. Le mode de parturition a un impact fort sur la composition initiale du microbiote intestinal. Les nouveaux nés délivrés par voie basse ont un microbiote proche du microbiote vaginal maternel, avec une abondance de *Lactobacillus*, *Prevotella* et *Bifidobacterium*. Les nouveau-nés délivrés par césarienne présentent un microbiote proche du microbiote cutané maternel, avec une abondance de *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). En outre, les enfants nés par césarienne présentent une diversité microbienne inférieure aux enfants nés par voie basse, notamment un manque de *Bifidobacterium*, et ce jusqu'à l'âge de 12 mois (Bäckhed *et al.*, 2015). L'impact du mode de parturition sur la composition du microbiote intestinal sur le long terme, en particulier chez l'adulte, reste cependant débattu (Arboleya *et al.*, 2013, Sassin *et al.*, 2022).

En plus du mode de parturition, de nombreux facteurs impactent le développement du microbiote après la naissance : le fait d'être allaité ou non, la prise d'antibiotiques, l'environnement ou encore des facteurs génétiques. D'une manière générale, ce sont des espèces anaérobies facultatives qui vont coloniser en premier le tube digestif des nouveaux-nés comme les *Staphylococcus*, les *Streptococcus*, les *Enterococcus* et les *Enterobacterium*.



En participant à créer un environnement anaérobie dans le tube digestif, cette première colonisation va être suivie par l'arrivée d'espèces anaérobies strictes telles que les *Bifidobacterium*, les *Bacteroides*, les *Clostridium* et les *Eubacterium*. Le genre *Bifidobacterium* va augmenter vers 2-4 mois, notamment suite à la consommation de lait et durer jusqu'à l'absorption de nourriture solide qui verra une diminution de ce genre et une augmentation du phylum des *Bacillota* (ancien *Firmicutes*, Oren et Garrity, 2021) (de Muinck et Trosvik, 2018). On estime que la composition du microbiote va se stabiliser vers l'âge de 2-3 ans (Yatsunenko *et al.*, 2012).

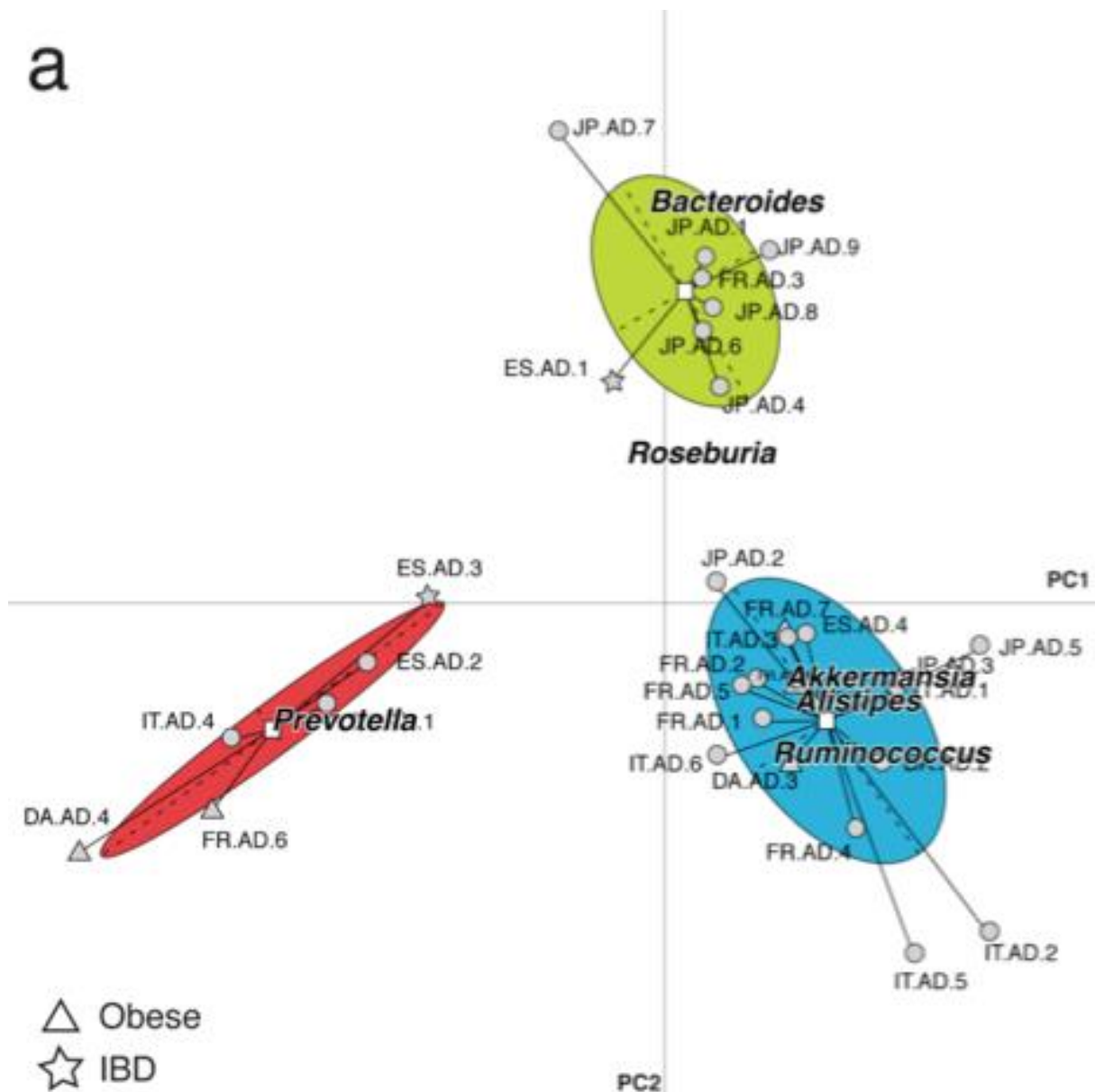
### Composition du microbiote chez l'adulte et entérotypes

Le nombre de bactéries hébergées dans l'intestin d'un adulte est estimé entre  $10^{13}$  et  $10^{14}$  bactéries (Sender *et al.*, 2016). Le microbiote intestinal est celui contenant le plus grand nombre de bactéries et la plus grande diversité d'espèces. Le pangéome du microbiote intestinal, c'est à dire l'ensemble de tous les gènes qui ont été identifiés au sein de ce microbiote, s'élève à plus de 20 millions (Tierney *et al.*, 2019). Ce chiffre est à mettre en relation avec les 20 000-25 000 gènes présent dans le génome humain : le potentiel génétique apporté par le microbiote intestinal est donc colossal.

Avec l'arrivée des nouvelles techniques de séquençage dans les années 2000, des projets de séquençage du métagénome du microbiote se sont mis en place, notamment le MetaHit (Qin *et al.*, 2010) et le Human Microbiome Project (2012). Les bases de données ainsi générées ont depuis bénéficié de l'ajout régulier de nouvelles cohortes (Almeida *et al.*, 2021). L'analyse des bases de données actuelles que le nombre total d'espèces bactériennes différentes identifiées est de 4 616 et le nombre d'Archées de 28 au sein de l'ensemble des métagénomés disponibles.

Parmi ces espèces, 71% n'ont pas à ce jour de représentant qui ai été cultivé. (Almerida *et al.*, 2021). Les espèces les plus retrouvés sont *Eubacterium rectale*, *Escherichia coli* et *Bacteroides uniformis* pour les bactéries et *Methanobrevibacter smithii* pour les archées. A l'échelle des phylla, ce sont les *Bacillota*, les *Actinobacteriota*, les *Bacteroidota* (ancien *Bacteroidetes*) et les *Pseudomonodota* qui sont les plus représentés au sein du microbiote intestinal Arumugam *et al.*, (2011) ont mis en évidence qu'il existait 3 grands entérotypes dans l'espèce humaine. Ces entérotypes sont définis par un ensemble d'espèces bactériennes retrouvées dans la population humaine qui ne sont pas dépendantes de l'âge, du sexe, de l'ethnie ou de la localisation géographique.

a



**Figure 12 : Les 3 entérotypes du microbiote intestinal chez l'Homme.** Clustering des espèces bactériennes du microbiote intestinal de différents individus sains, mettant en évidence la présence de trois entérotypes, nommés d'après les genres bactériens principaux les caractérisant : *Bacteroides* (vert), *Prevotella* (rouge), et *Ruminococcus* (bleu) (Arumugam *et al.*, 2011).

Les 3 entérotypes humains sont nommés d'après trois genres bactériens, *Ruminococcus*, *Bacteroides* et *Prevotella*, qui présentent des différences d'abondance importantes entre ces entérotypes (**Figure 12**). La mise en évidence de ce concept a été une étape importante dans l'étude du microbiote intestinal, en permettant de simplifier la complexité des microbiotes.

Depuis la parution de l'article de Arumugam *et al.*, en 2011, cette notion de l'existence de 3 entérotypes a fait débat et d'autres entérotypes ont depuis été proposés (Costea *et al.*, 2018).

### I.IV.2 Rôle du microbiote intestinal

L'utilisation de modèles animaux dépourvus de microbiote (animaux axéniques ou germ-free), essentiellement des souris, ont permis de montrer l'importance des fonctions que remplit le microbiote intestinal. En effet, si la présence du microbiote n'est pas indispensable pour la viabilité des souris, de nombreux paramètres intestinaux sont altérés en son absence, notamment la morphologie intestinale, les capacités métaboliques et la réponse immunitaire (Smith *et al.*, 2007).

#### Métabolisme et rôle du microbiote dans la digestion

Le pangénome du microbiote intestinal contient environ 50 000 gènes impliqués dans le métabolisme, ce qui représente près de la moitié des gènes du microbiome possédant une fonction connue (Almeida *et al.*, 2021). Au niveau du côlon, 95% des nutriments ont été absorbés. Il reste donc essentiellement des éléments n'ayant pas pu être pris en charge par l'arsenal enzymatique du tube digestif. Les micro-organismes présents au niveau du côlon vont métaboliser une partie de ces éléments non assimilés et produire en retour des métabolites plus simples. Ces derniers pourront alors être « récupérés » par l'Homme et absorbés par l'épithélium du côlon.

C'est par exemple le cas des acides gras à chaînes courtes (ou SCFA pour Small Chain Fatty-Acid). Les SCFA sont produits lors de la fermentation par les bactéries du microbiote des fibres alimentaires non digérées. Les SCFA majoritaires présents dans l'intestin sont l'acétate, le propionate et le butyrate (avec des proportions qui varient selon les études) (Cong *et al.*, 2022). On retrouve généralement l'ordre suivant : [acétate] > [propionate] > [butyrate]. Ces

SCFA vont ensuite être absorbés au niveau intestinal et soit être directement utilisés par les colonocytes soit passer dans la circulation sanguine. Ils représentent à eux seuls près de 10%

de l'énergie récupérée (indirectement) par l'organisme à partir de l'alimentation (Adak et Khan., 2019). La capacité de production d'acétate est largement distribuée parmi les bactéries du microbiote intestinal. Certaines espèces semblent cependant être des contributeurs majoritaires dans cette production comme *Bacteroides thetaiotaomicron* ou *Akkermansia muciniphila* (Gonzalez *et al.*, 2019).

L'acétate peut être directement utilisé par les colonocytes ou diffuser, via la circulation sanguine dans le reste de l'organisme pour être utilisé par les tissus périphériques (Hertli and Zimmerman, 2022). Le propionate est principalement produit par le phylum des Bacteroidota et a un rôle similaire à l'acétate. Le propionate va en particulier être utilisé par les cellules hépatiques (Hertli and Zimmerman, 2022). Le butyrate est majoritairement produit par le phylum des Bacillota, notamment *Faecalibacterium prausnitzii* et *Roseburia spp* et est la principale source d'énergie des colonocytes. Il est en outre associé à de nombreux effets bénéfiques tels qu'une activité anti-inflammatoire via l'inhibition de la voie NF-kB et la polarisation de lymphocytes T en T<sub>reg</sub>, producteurs d'IL-10 ou un renforcement de la barrière intestinale via l'augmentation de l'expression de protéines de jonction et la sécrétion de mucus (Bach Knudsen *et al.*, 2018).

En l'absence de microbiote, les souris axéniques présentent un déficit en SCFA mais également en vitamines B et K (Smith *et al.*, 2007). Ces données démontrent que ces deux vitamines sont synthétisées par le microbiote intestinal. Bien que, chez l'Homme, l'alimentation est d'ordinaire une source suffisante de vitamine B, le microbiote est en revanche indispensable dans la synthèse de la vitamine K1, grâce à des bactéries comme *Enterobacter*, *Eubacterium lentum*, *Veillonella* et *Bacteroides* (Herli and Zimmerman, 2022).

#### Rôle du microbiote dans la défense contre les micro-organismes pathogènes

Il est indispensable que les systèmes de défense de l'organisme soient capables de distinguer les bactéries commensales ou symbiotiques des pathogènes afin de ne pas établir un état d'inflammation constant, dû à la présence des bactéries du microbiote, ni de laisser des pathogènes proliférer et menacer la santé de l'organisme. Le microbiote intestinal a un effet important sur le développement des systèmes de défense de la barrière intestinale de l'hôte. Ainsi, chez des souris axéniques, il a été montré que le nombre et la taille des cellules caliciformes, ainsi que l'épaisseur de la couche de mucus, étaient inférieurs à ceux de souris conventionnelles (Kandori *et al.*, 1996).





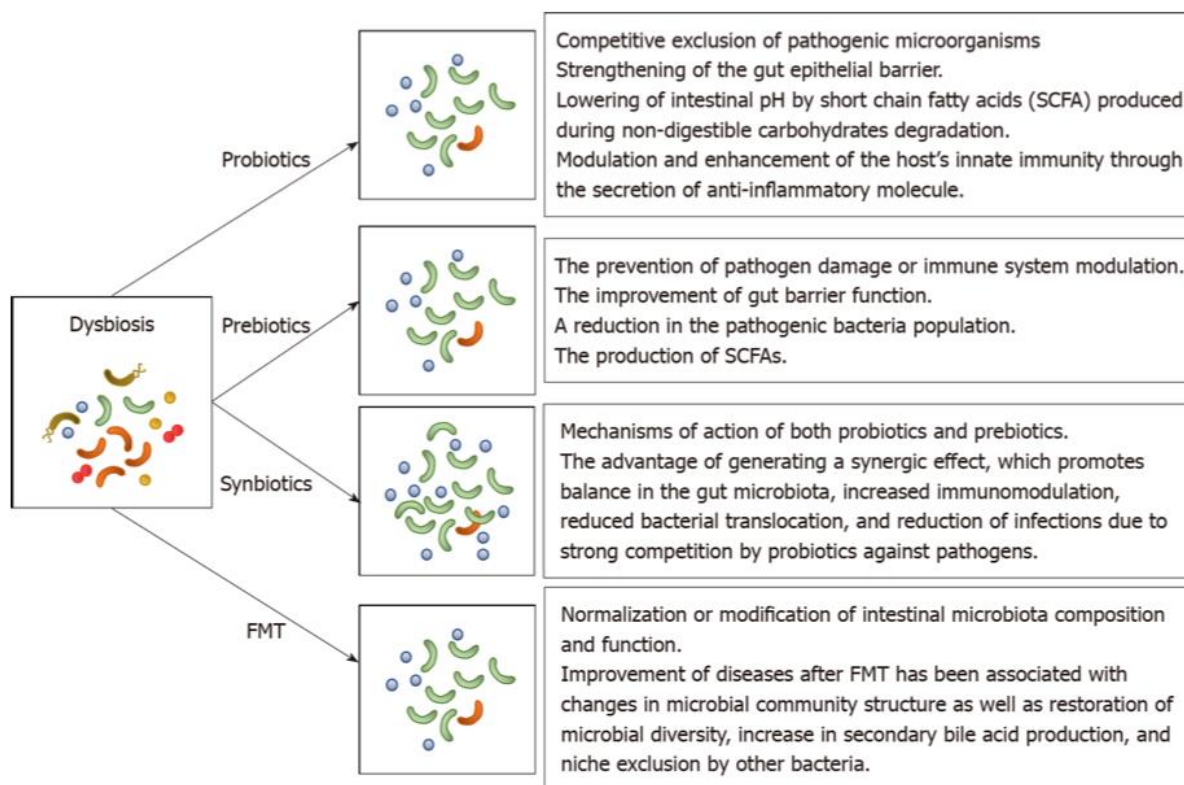
Ces altérations de la couche de mucus sont compensées si ces souris axéniques sont recolonisées par des bactéries commensales (He *et al.*, 2003). La production de SCFA par les bactéries du microbiote régule d'autre part la perméabilité intestinale en modulant l'expression des protéines de jonctions serrées.

Enfin, le microbiote intestinal régule directement l'activation du système immunitaire. L'absence de microbiote conduit en effet à des altérations de développement du système immunitaire (Yang *et al.*, 2022). Les souris axéniques ont une capacité d'activation plus faible des cellules dendritiques (Stagg *et al.*, 2007), un déficit de production d'IL-22 (Satoh-Takyama *et al.*, 2008) et, de manière plus générale, une diminution du nombre de lymphocytes T<sub>h</sub>17 (Shaw *et al.*, 2012). Les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) constituent un exemple de bactéries agissant sur la maturation du système immunitaire. Ces bactéries sont spécifiquement situées dans l'iléon où elles adhèrent au mucus dans des zones situées au-dessus des plaques de Peyer. Leur implantation dans des souris axéniques a montré qu'elles induisaient une augmentation de la production de lymphocytes Th17, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion des IgA (Oemcke *et al.*, 2021).

#### Résistance à la colonisation

Le microbiote commensal a un rôle important de protection contre les micro-organismes pathogènes qui s'ajoute à la protection offerte par le mucus et ses constituants. En induisant une compétition pour l'espace et les ressources, les bactéries du microbiote préviennent l'installation de bactéries pathogènes (un phénomène nommé « résistance à la colonisation ») (Bron *et al.*, 2017). Un certain nombre de bactéries commensales sont capables de sécréter des bactériocines (Huang *et al.*, 2021). Ces molécules sont des peptides antibactériens sécrétés par les bactéries qui peuvent également avoir des effets anti-inflammatoires. Certaines bactéries possèdent un système de sécrétion de type 6 (T6SS), notamment *Bacteroides fragilis*, permettant de tuer directement des bactéries cibles (potentiellement pathogènes) (Verster *et al.*, 2017). Certains travaux ont cependant suggéré que le spectre d'action du T6SS serait trop limité pour avoir un impact significatif dans la préservation de l'équilibre de l'écosystème du microbiote (Coyne et Comstock, 2019).

Enfin, les bactéries du microbiote peuvent convertir les acides biliaires primaires (produits par le foie et impliqués dans la solubilisation des lipides) en acides biliaires



**Figure 13 : Exemples de thérapies ciblant le microbiote intestinal.** Les probiotiques vont agir à travers la sécrétion de bactériocines, de molécules renforçant la barrière intestinale et/ou par l’instauration d’une compétition pour l’espace ou pour les ressources. Les prébiotiques vont favoriser la prolifération de bactéries déjà présentes dans le microbiote et possédant des propriétés similaires à celles des probiotiques. Les synbiotiques permettent de cumuler les avantages de pré- et des probiotiques. La transplantation de microbiote fécal (FMT) permet de recoloniser le tube digestif d’un patient par un microbiote « sain » (eubiotique) et donc de restaurer les fonctions de ce dernier (Nishida *et al.*, 2022).

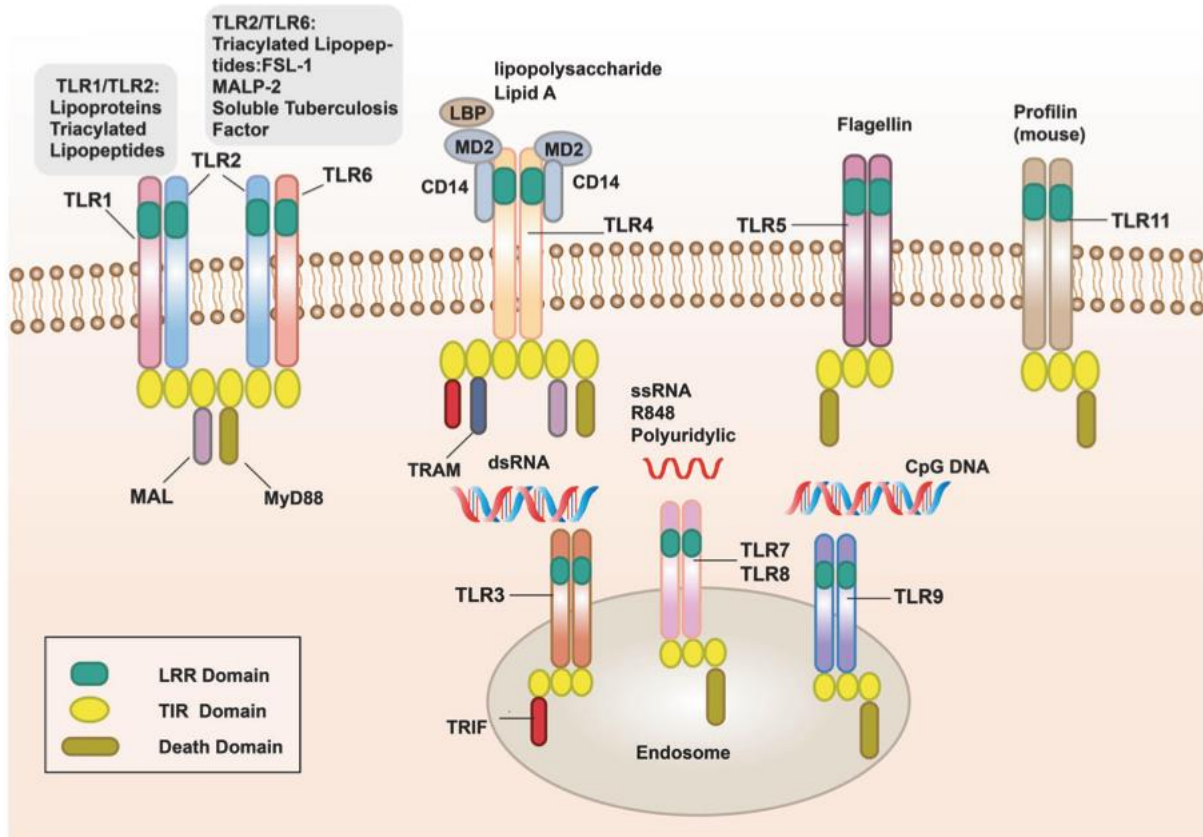
secondaires comme le deoxycholate, l'ursodeoxycholate ou le lithocholate, qui ont une activité bactéricide contre certains pathogènes (Yu *et al.*, 2019).

Lorsque le microbiote est fragilisé, comme notamment lors de la prise d'antibiotique, la pression exercée par les bactéries commensales sur d'éventuelle bactéries pathogènes diminue et ces dernières auront la possibilité de coloniser une partie des niches maintenant disponibles, suite à la disparition des commensales.

### I.IV.3 Dysbiose intestinale et pathologies

Lorsque la composition du microbiote est modifiée de façon durable, on parle de dysbiose. La dysbiose correspond à un déséquilibre dans la composition du microbiote comparé à un état « sain », parfois appelé eubiose (Kalia *et al.*, 2022). De très nombreux travaux ont essayé de mettre en évidence un lien entre dysbiose intestinale et apparition de pathologies, des pathologies touchant aussi bien l'intestin que des organes « distants » comme le foie, le cœur ou même le système nerveux central. Dans la plupart des cas cependant, la démonstration du lien de causalité entre dysbiose et apparition d'une pathologie reste à effectuer (Cani, 2017).

Ce lien de cause à effet est essentiel pour justifier le développement de thérapies visant à moduler la composition du microbiote intestinal. Ces thérapies incluent les prébiotiques, les probiotiques, les synbiotiques et les greffes de microbiote fécal (ou FMT pour Fecal Microbiota Transplantation) (**Figure 13**). Les prébiotiques sont des « composés induisant des changements spécifiques dans la composition ou dans l'activité du microbiote intestinal, conférant un bénéfice pour la santé » (Davani-Davari *et al.*, 2019). Les probiotiques sont « des organismes vivants qui, administrés dans des conditions adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (Schrezenmeir et de Vrese, 2001). Les synbiotiques sont une combinaison de prébiotiques et de probiotiques. La greffe de microbiote fécal correspond au transfert des micro-organismes contenus dans un échantillon de selles d'un donneur dans l'intestin d'un individu receveur. Ce type de méthode a montré des résultats très encourageant dans le traitement des infections à *Clostridioides difficile* (Nishida *et al.*, 2022).



**Figure 14 : Structure des TLR et ligands associés.** Les homodimères TLR4 et TLR5, ainsi que les hétérodimères TLR2-TLR1 et TLR2-TLR6, sont enchâssés dans la membrane plasmique et détectent des ligands extra-cellulaires. Les homodimères TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont enchâssés dans la membrane des endosomes et détectent des molécules à l'intérieur de ce compartiment (Li et Wu, 2021).

## II – Interactions hôte-bactéries intestinales

### II.I Détection et réponse à la présence de bactéries pathogènes

#### II.I.1 Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR)

Le bon fonctionnement de l'organisme nécessite la capacité pour celui-ci de détecter et d'éliminer les organismes pathogènes pouvant lui porter atteinte, tout en prévenant toute réaction vis à vis des espèces appartenant au microbiote. La détection des bactéries passe par la reconnaissance de molécules bactériennes particulières, le plus souvent exposées dans la paroi ou dans la membrane plasmique des bactéries. Les molécules reconnues sont appelées PAMP ou MAMP et les récepteurs cellulaires permettant cette reconnaissance sont nommés PRR (pour Pathogen Recognition Receptor).


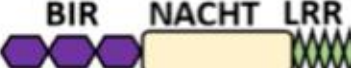
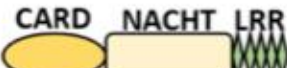






Les PRR connus actuellement sont divisés en 5 grandes catégories : les récepteurs de type Toll (ou TLR pour Toll-Like-Receptor), les récepteurs de type « domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides » (ou NLR pour Nucleotide Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptor), les récepteurs de type « RIG-I » (ou RLR pour Retinoic acid-Inducible Gene (RIG)-I-Like Receptor), les récepteurs de type lectine de type C (ou CLR pour C-Like Receptor) et les récepteurs de type ALR (pour Absent in melanoma-2-Like Receptor) (Li et Wu, 2021).

#### Les récepteurs de type TLR

La famille des TLRs est une famille de récepteurs transmembranaires comportant 10 récepteurs différents chez l'Humain (TLR1-TLR10) (**Figure 14**). Les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10 sont exprimés à la surface des cellules alors que les TLR 3, 7, 8 et 9 sont situés sur les membranes de compartiments intra-cellulaires tels que le réticulum endoplasmique, les phagosomes ou les lysosomes. Dans ce cas, le domaine de fixation du ligand de ces récepteurs est orienté vers la lumière de ces vacuoles, ce qui permet de détecter d'éventuels pathogènes capturés ou résidant à l'intérieur de ces compartiments intracellulaires.

Lorsqu'un ligand se fixe sur les récepteurs TLR, ce dernier est activé et induit une cascade de signalisation. Deux voies de signalisation principales existent : la voie MyD88,

**Tableau 4 : Diversité des NLR.** (Babamale et Chen, 2021)

NLRs Family	Sub-Family/Domain Architectures	Gene	
Acidic transcription-carrying domain (NLRA)		<i>CIITA (NLRA)</i>	
BIR- carrying domain (NLRB)		<i>NLRB (NAIP)</i>	
CARD—carrying domain (NLRC)		<i>NOD1, NLRC4 NOD2</i>	
			
PYD-carrying domain		<i>NLRP2-NLRP9 NLRP11-NLRP14</i>	
	Additional domain (FIIND)		<i>NLRP1</i>
	No LRR		<i>NLRP10</i>
Unidentified domain	NLRs without PYD nor CARD 	<i>NLRC3 NLRC5 NLRX1</i>	
NLR-related molecules		<i>Apaf-1</i>	

CARDs, Caspase activation and recruitment domains; PYD, PYRIN domain; NACHT, Nucleotide-binding and oligomerization; BIR, Baculoviral inhibitory repeat; AD, Acidic domain; FIIND, Function to find; LRR, Leucine-rich repeat; WD40, Beta-transducin or WD-40 repeat.

partagée par tous les TLR à l'exception de TLR3, et la voie dépendante de TRIF qui fait suite, par exemple, à l'activation du TLR3 ou du TLR4. L'activation des récepteurs TLR induit généralement une réponse pro-inflammatoire. Cette réponse dépend en partie des TLR mobilisés et du type cellulaire exprimant ces TLR.

Chaque type cellulaire de l'organisme exprime un ensemble de TLR spécifiques. Au niveau de l'épithélium intestinal murin, seuls les TLR2, 4 et 5 sont présents. Le TLR4 est lui absent des cryptes de l'intestin grêle, mais présent au niveau des villosités et est par ailleurs le seul récepteur présent dans la partie distale du côlon, (Duan *et al.*, 2022).

### Les récepteurs de type NLR

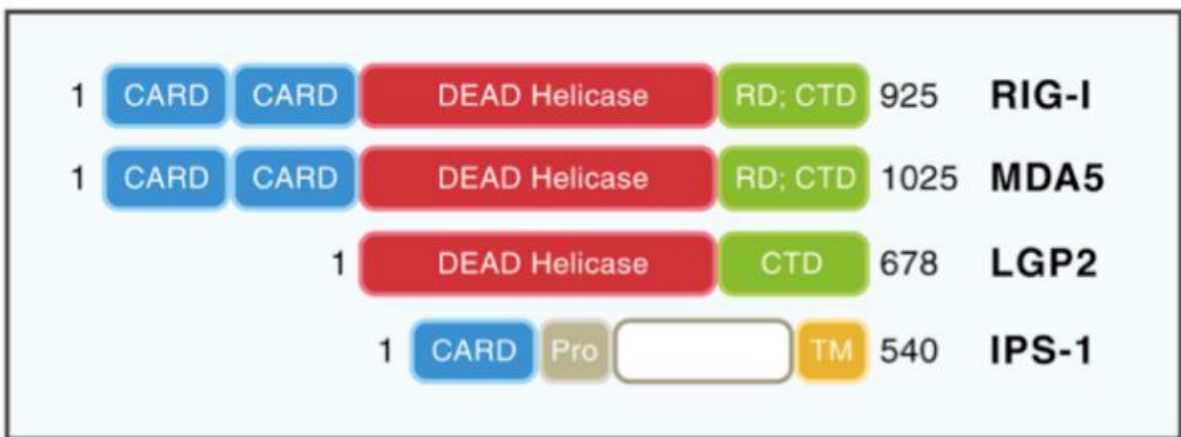
La famille des NLR comprend de nombreux récepteurs cytosoliques différents. Ils ont en commun d'être constitués d'un domaine C-terminal riche en Leucine (LRR, pour Leucine Riche Repeat) qui détecte les PAMP, une partie centrale permettant la liaison aux acides nucléiques et l'oligomérisation de ces récepteurs (NOD), et une partie N-terminale contenant le domaine effecteur qui déterminera également la sous-famille du récepteur (**Tableau 4**). Les récepteurs NOD sont classifiés en 4 groupes fonctionnels (Babamale et Chen., 2021).

- Les activateurs de transcription : l'activation des récepteurs NLRC et CIITA (Class II TransActivator, également appelé NRLA), par exemple, vont induire la transcription des gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et le CMH de classe II, respectivement (Leon Machado et Steimle., 2021).
- Les activateurs de la voie NF- $\kappa$ B/MAPK (ex : NOD1/NLRC1 et NOD2/NLRC2).
- Les activateurs de l'inflammasome (ex : NLRP3).
- Les modulateurs inhibant les réponses pro-inflammatoires (ex : NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP6, NLRP7, NLRP10, NLRP12 et NLRX1).

Les récepteurs NOD1 et NOD2, appartenant à la sous-famille des NLRC (pour NLR with Caspase Activation and Recruitment Domain) sont les mieux caractérisés (Li et Wu, 2021) :

- NOD1 est impliqué dans la reconnaissance des bactéries de type Gram négatif, via la détection de l'acide gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimélique (un constituant du peptidoglycane de ces bactéries).





**Figure 15** : Structure des récepteurs de la famille RIG-I et de l'adaptateur commun IPS-1. (Loo et Gale Jr., 2011)

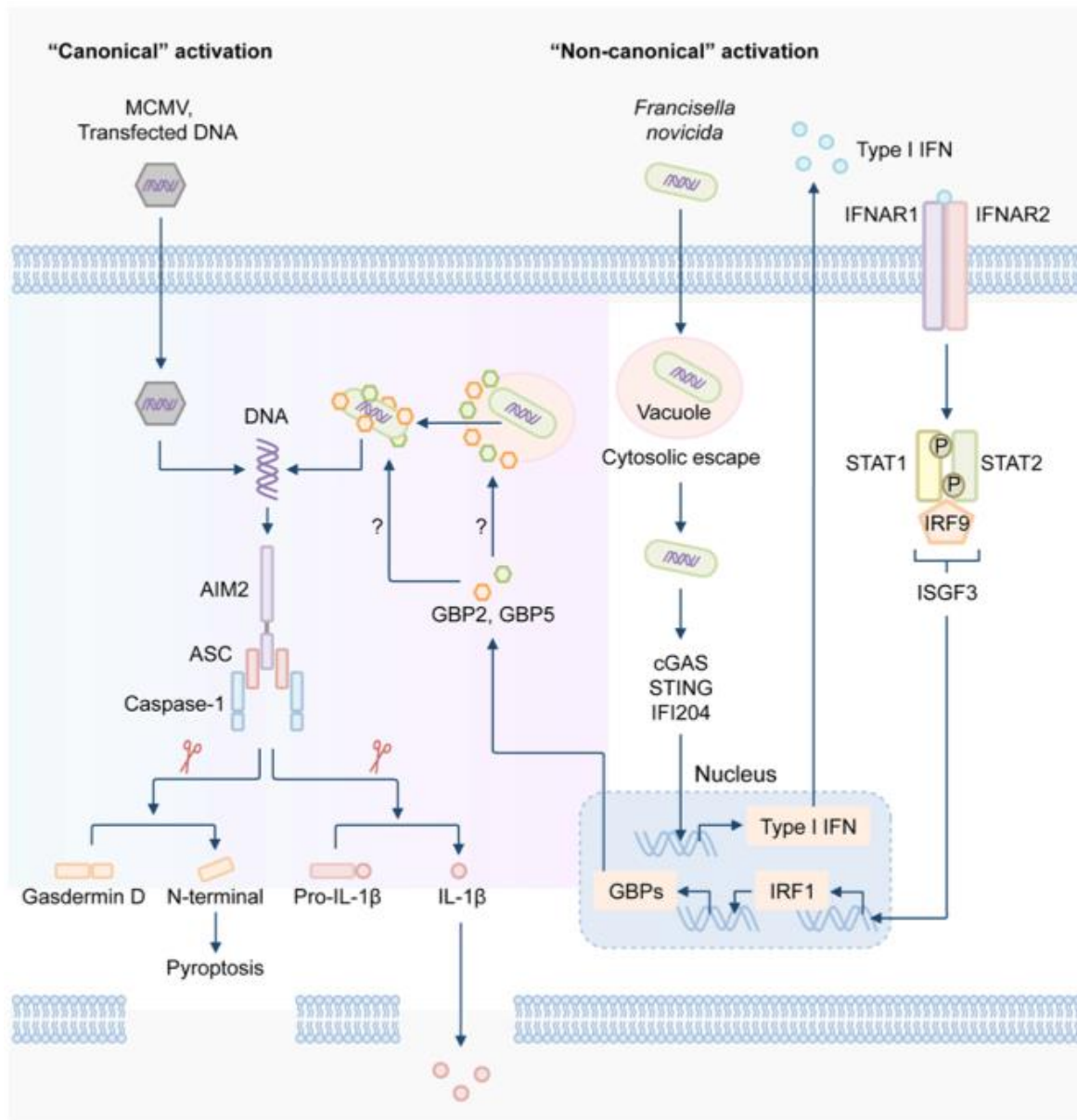
- NOD2 est impliqué principalement dans la reconnaissance des bactéries de type Gram positif, via la détection de l'acide muramique, un constituant du peptidoglycane de la paroi bactérienne. NOD2 est de plus capable de lier l'ARN double brin de virus.

La réponse induite par l'activation de NOD2 dépend du ligand détecté mais également du type cellulaire concerné. Ainsi dans les cellules épithéliales, la réponse va essentiellement amener à une sécrétion de peptides antimicrobiens, notamment les défensines par les cellules de Paneth (Alipoor et Mirsaedi, 2021). Dans les macrophages, l'activation de NOD 2 conduit à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et l'induction de la sécrétion de cytokines inflammatoires. Dans le cas où le ligand est de l'ARN viral, c'est la production IFN $\beta$  qui va être stimulée.

En plus de NOD1 et NOD2, NLRP3 (P pour Pyrin domain containing) est un récepteur d'intérêt particulier car son activation induit la formation de l'inflammasome. L'inflammasome est un ensemble de trois protéines cytoplasmiques : un senseur, un adaptateur et une pro-caspase/caspase. Ainsi dans l'inflammasome NLRP3, NLRP3 est le senseur, la protéine ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain) est l'adaptateur et la caspase associée est la caspase 1. L'activation de l'inflammasome nécessite en général deux étapes : Une première étape où l'activation de certains PRR (comme le TLR4) et/ou la présence de cytokines (comme le Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ou l'interféron  $\alpha$  (IFN $\alpha$ )) va conduire à une transcription des gènes codant pour l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, via la voie NF- $\kappa$ B, et la synthèse des précurseurs correspondants (pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18). Ensuite vient la seconde étape où NLRP3 est activé par des ligands intracellulaires (Paik *et al.*, 2021). Cela a pour conséquence l'autoprotéolyse de la pro-caspase 1 en caspase 1. Cette dernière permet le clivage des précurseurs pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 en cytokines matures IL-1 $\beta$  et IL-18 qui seront sécrétées.

### Les récepteurs de type RLR

Les RLR sont des récepteurs cytosoliques dont les ligands sont des séquences d'ARN ou d'ADN doubles brins provenant essentiellement des virus (Loo et Gal Jr., 2011). A ce jour, trois types de récepteurs différents appartenant à la famille des RLR ont été décrits : RIG-I (pour Retinoic acid-inducible gene I), MDA5 (pour Melanoma Differentiation Associated factor 5) et LGP2 (pour Laboratory of Genetic and Physiology 2) (Xu *et al.*, 2022) (**Figure 15**).



**Figure 16 : Fonctionnement du récepteur AIM2 et de l'inflammasome.** La protéine ASC est recrutée au niveau du récepteur AIM2 suite à la détection d'ADN double brin par ce dernier. La protéine ASC possède un domaine CARD permettant de recruter la pro-caspase-1 et la formation de l'inflammasome (Mann *et al.*, 2016). Le cytomegalovirus (CMV) murin ou les molécules de type poly(dA:dT) sont des activateurs directs de la voie « canonique » de l'inflammasome AIM2. Dans le cas de la voie « non canonique », induite par exemple par la bactérie pathogène *Francisella novicida*, l'activation de l'inflammasome AIM2 nécessite une induction de l'expression des gènes codant pour les GTPases GBP2 et GBP5, qui sont sous le contrôle du facteur de transcription IRF1. L'ADN de *F. novicida* ne déclenche pas directement la formation de l'inflammasome, mais active des senseurs à l'ADN que sont cGAS, STING et IFI204. Ceux-ci vont induire la sécrétion d'IFN de type I qui, en retour, vont permettre l'assemblage de l'inflammasome et conduire vers la pyroptose et libération de cytokines. (Mann *et al.*, 2016)

RIG-I et MDA5 sont très proches structurellement et fonctionnellement. Tous deux induisent l'expression d'interférons ( $\text{IFN}\alpha$  et  $\beta$ ), via la protéine IPS-1 en réponse à la détection d'ARN viral double brin (Brisse et Ly, 2019). LGP2 est moins bien connu que les deux précédents mais il lui est principalement associé un rôle modulateur de MDA5 (Rodriguez *et al.*, 2014).

Ces récepteurs sont exprimés dans la plupart des tissus et sont essentiels dans le déclenchement de la réaction antivirale dans les cellules épithéliales.

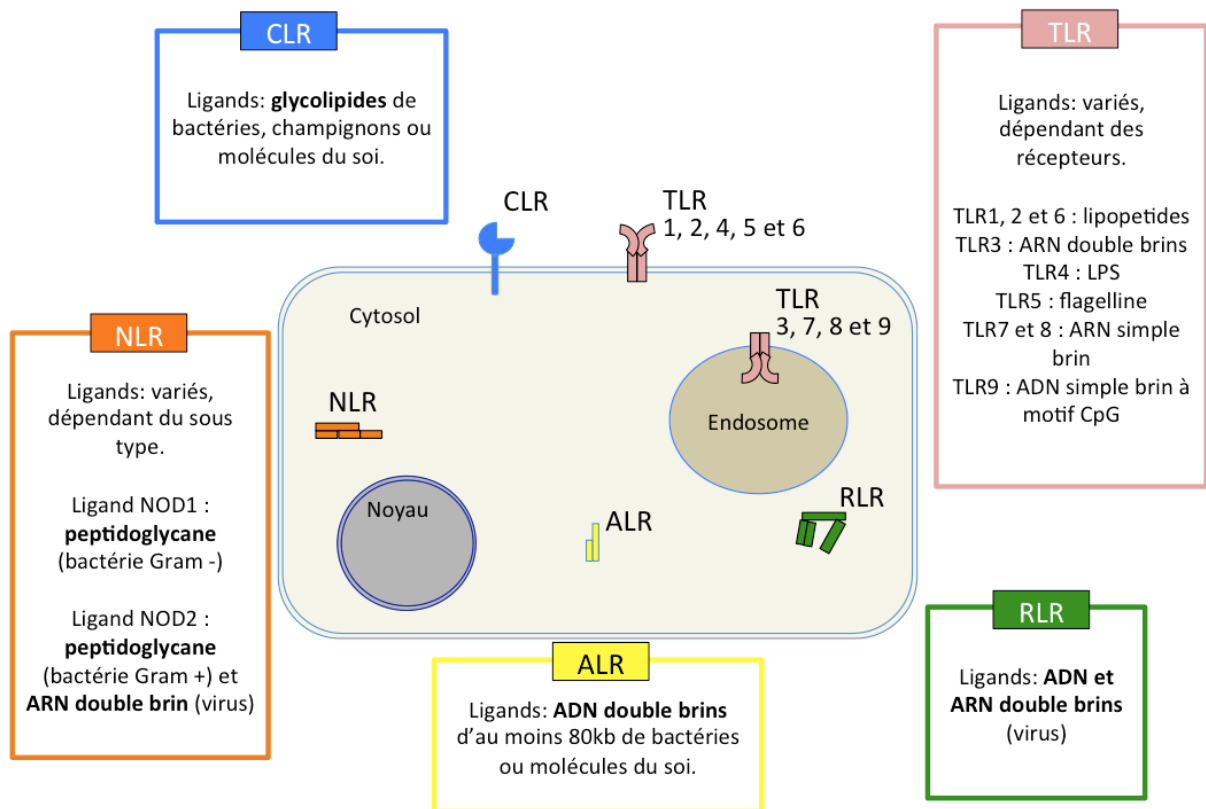
### Les récepteurs de type CLR

Les CLR sont des récepteurs membranaires qui reconnaissent des glycolipides à la surface des champignons unicellulaires, des bactéries ou encore provenant du soi (Torigoe *et al.*, 2021). Ces récepteurs sont présents sur les macrophages et les cellules dendritiques. La liaison d'un ligand sur un CLR va entraîner une réponse spécifique. Ainsi, la détection de PAMPs ou de composant du soi altéré (par la présentation à la surface de la cellule de glycolipides normalement intracellulaires) va induire une réponse inflammatoire. De façon intéressante, il semble que les CLR soit capables de reconnaître des bactéries commensales et des cellules saines et que cette interaction n'entraîne pas de cascade inflammatoire. Les mécanismes permettant à ces récepteurs de distinguer le « bon » du « mauvais » restent actuellement mal caractérisés.

### Les récepteurs de type ALR

Les ALR sont des récepteurs cytosoliques fixant des fragments d'au moins 80 pb d'ADN double brin, provenant de bactéries ou de l'hôte. Le principale membre de cette famille est AIM2. L'activation de ces récepteurs induit la formation de l'inflammasome via l'association de l'ALR (senseur) avec l'adaptateur AS et la caspase 1. Cet inflammasome catalyse la maturation et la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ .

Il peut également induire la mort de la cellule par un mécanisme appelé pyroptose (Man *et al.*, 2016) (**Figure 16**). La famille de récepteurs ALR a été mise en évidence récemment et semble impliquée dans les pathologies infectieuses.



**Figure 17** : Grandes familles de PRR et principaux ligands associés.

L'ensemble des PRR et de leurs activateurs est résumé sur la **Figure 17**.

### II.I.2 Capter les éléments extracellulaires

La cellule échange en permanence avec le milieu extérieur afin d'assurer son apport en énergie (entrée de molécules organiques à dégrader), maintenir sa pression osmotique (flux d'eau et d'ions) et limiter l'accumulation de produits néfastes (élimination des déchets du métabolisme).

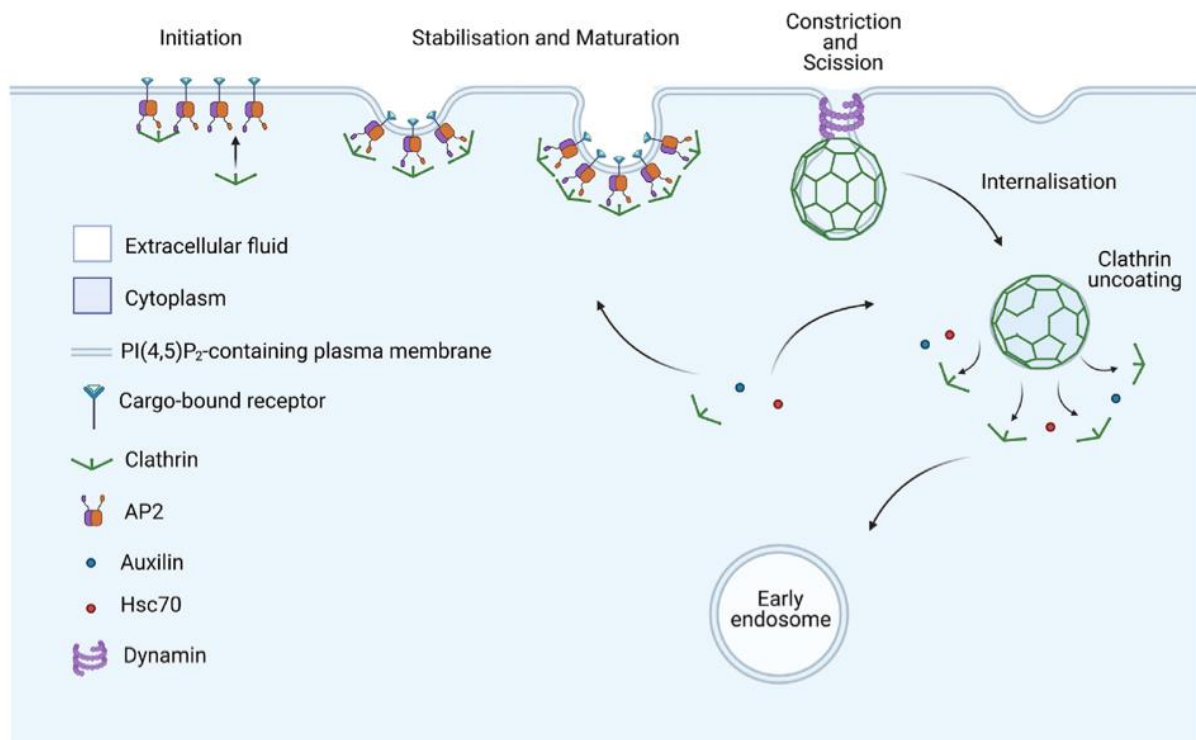
La cellule animale étant séparée du milieu extérieur par sa membrane plasmique, plusieurs mécanismes existent pour faire passer des éléments de part et d'autre de cette membrane. L'endocytose correspond à l'entrée de molécules dans la cellule suite à une déformation de la membrane plasmique. Il existe trois mécanismes principaux d'endocytose : l'endocytose médiée par des récepteurs, la pinocytose (micro- ou macro-pinocytose, en fonction de la taille des éléments incorporés) et la phagocytose (Khan et Steeg., 2021).

#### L'endocytose médiée par des récepteurs

Cette forme d'endocytose permet à la cellule de sélectionner les molécules internalisées, via l'utilisation de récepteurs spécifiques.

On distingue trois types d'endocytose : l'endocytose via les clathrines (ou CME pour clathrin-mediated endocytosis), via les caveolae (CavME pour caveolae-mediated endocytosis) et l'endocytose indépendante des clathrines et des caveolae (CLIC/GEEC).

La CME est la forme d'endocytose plus étudiée. Elle est impliquée dans l'internalisation de petites molécules comme les lipoprotéines, les nutriments et dans le recyclage de récepteurs, notamment les récepteurs couplés aux protéines G (Khan et Steeg, 2021). Elle fait intervenir des protéines nommées clathrines localisées à la surface du puit d'endocytose et parfois appelées « protéines manteaux ». Les clathrines sont reliées à la membrane plasmique via les protéines AP2. Ces dernières sont liées à des protéines cargo faisant face au milieu extracellulaire. Lorsqu'un ligand se fixe à l'un de ces cargos, il y a formation d'un « puit » d'endocytose dans la membrane plasmique (**Figure 18**). La vésicule en formation va se détacher de la membrane sous l'action des dynamines, qui vont permettre une constriction de la



Current Opinion in Structural Biology

**Figure 18 : Endocytose médiée par les clathrines.** Les clathrines se lie à la protéine AP2 qui, elle-même, interagit avec les protéines cargo enchassées dans la membrane. Lorsqu' un ligand se lie à une protéine cargo du côté extracellulaire, cela entraîne le recrutement de protéines accessoires permettant l'invagination et la croissance du « puit » d'endocytose. Les clathrines permettent de soutenir la structure de la vacuole en cours de croissance. La dynamine va ensuite permettre de séparer la vacuole ainsi formée de la membrane plasmique. Les clathrines vont ensuite se détacher, être recyclées par le biais de protéines telles que l'auxiline et Hsc70 et se fixer de nouveau sur les protéines AP2 situées sous la membrane plasmique (Smith and Smith, 2022).

membrane plasmique et une séparation de la vacuole d'endocytose. Les clathrines vont alors se détacher, donnant naissance à un endosome dit « précoce ».

La CavME est un type d'endocytose important dans le processus de « transcytose ». La CavME tire son nom de la formation d'invaginations cytoplasmiques de 50 à 60 nm appelées calveolae. La formation des calveolae implique les caveolines (insérées dans le feuillet interne de membrane plasmique) et les cavines (cytoplasmiques). La fixation de ligands à des protéines cargos présentes dans les calveolae induit, comme dans le cas de la CME, la formation d'un puits d'endocytose aboutissant à l'isolement d'un endosome (Parton *et al.*, 2021).

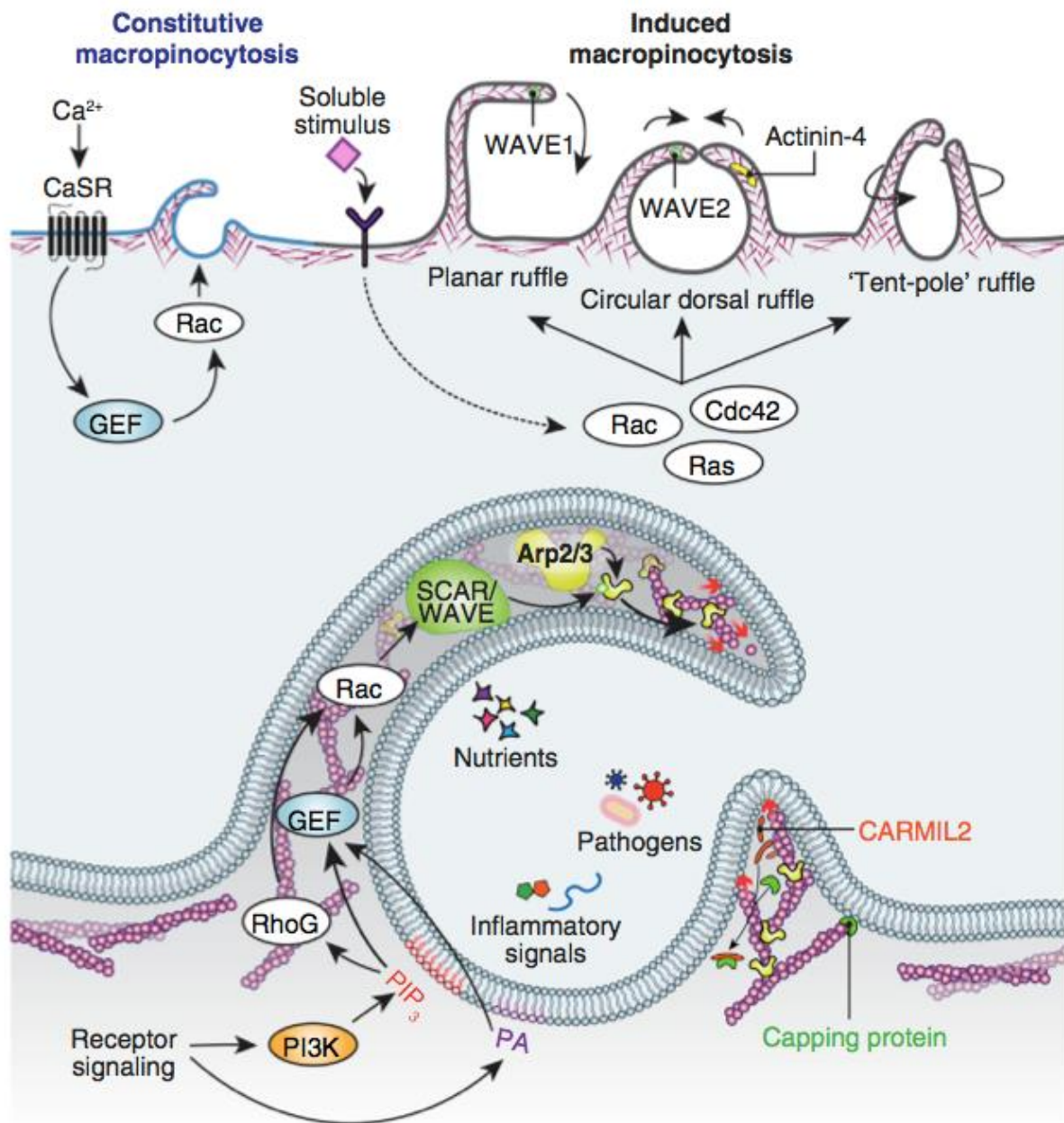
La CLIC/GEEC ne requiert pas de protéines particulières comme les clathrines ou les caveolines. Elle inclut différentes voies : une voie endophiline, dynamine et RhoA-dépendante, impliquée dans l'internalisation du récepteur à l'interleukine-2, une voie indépendante de la dynamine nécessitant l'actine, et une voie ARF6-dépendante, qui permet l'internalisation du complexe majeur d'histocompatibilité.

Ces différentes formes d'endocytose permettent l'internalisation de petites molécules (nutriments, récepteurs, etc.). La taille des endosomes générés est comprise entre 60 nm et 150 nm de diamètre.

### La pinocytose

La pinocytose est un mécanisme ubiquitaire durant lequel la membrane plasmique se déforme et conduit à la formation d'extensions membranaires qui vont « retomber » sur la membrane plasmique avec laquelle elles vont fusionner, emprisonnant ainsi une partie du milieu extracellulaire dans des vacuoles. On distingue la macropinocytose (vacuoles d'un diamètre > 250 nm) et la micropinocytose (vacuoles d'un diamètre < 250 nm) (Mylvaganam *et al.*, 2021). Ce processus est normalement inductible, en réponse à des facteurs de croissance, à l'exception des macrophages et des cellules dendritiques chez lesquels la macropinocytose est constitutive. Ce mécanisme leur permet d'échantillonner leur environnement en permanence et de détecter d'éventuels antigènes circulants (**Figure 19**).





Current Biology

**Figure 19** : Schéma de la (macro)pinocytose. La macropinocytose peut être induite par des signaux intracellulaires (flux de  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou extracellulaires (détection de facteurs de croissance). Une cascade de signalisation va activer entrainer la polymérisation de l'actine et la formation d'extensions membranaires (« ruffles ») pouvant prendre différentes formes. Ces extensions retombent sur la membrane plasmique, « emprisonnant » une portion de liquide extracellulaire et l'internalisant dans une vacuole intracellulaire (Mylvaganam *et al.*, 2021).

## La phagocytose

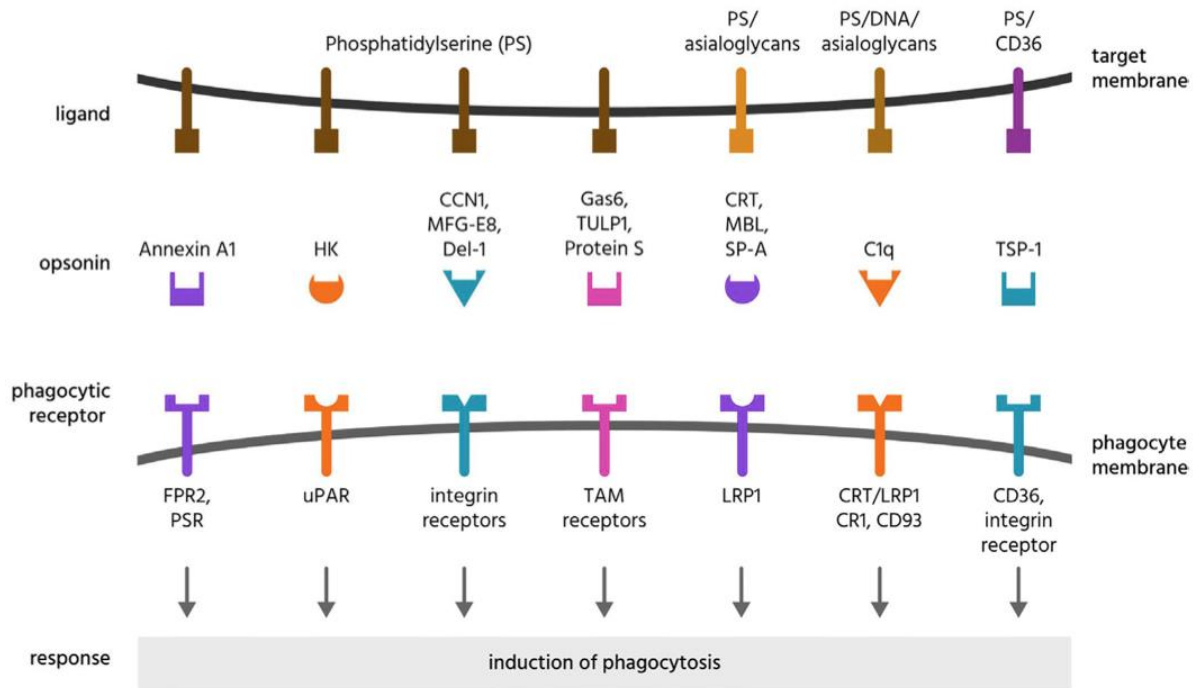
La phagocytose est un processus d'endocytose qui permet l'internalisation d'éléments d'une taille supérieure à 0,5  $\mu\text{m}$ . Elle est semblable à la macropinocytose, à l'exception très importante que la macropinocytose internalise aléatoirement du contenu du milieu extracellulaire, alors que la phagocytose est induite en réponse à la détection de molécules spécifiques sur les éléments à phagocyter.

On distingue généralement deux types de cellules phagocytaires : les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles. Les premières comprennent les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les ostéoclastes (Uribe-Querol et Rosales, 2020). Ces cellules vont internaliser les pathogènes, les éliminer et présenter leurs antigènes aux lymphocytes afin de déclencher la réponse immunitaire adaptative. Elles sont également impliquées dans la dégradation des cellules du « soi altéré », comme les cellules cancéreuses.

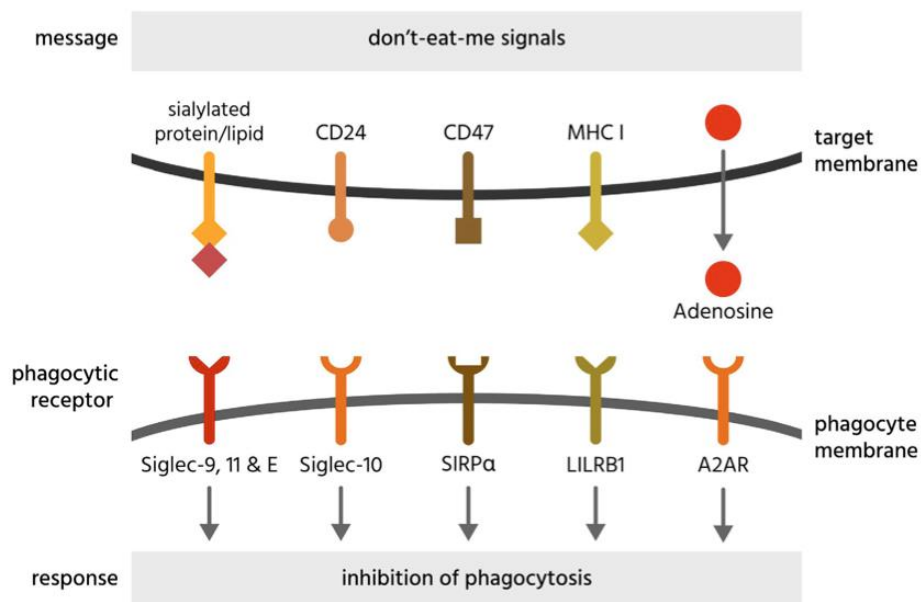
Les cellules phagocytaires non professionnelles sont capables d'effectuer une forme de phagocytose, avec une efficacité moindre (c'est à dire avec une vitesse et une taille des éléments internalisés moins importantes) (Uribe-Querol et Rosales, 2020). On retrouve parmi ces cellules des fibroblastes, des cellules épithéliales et des cellules endothéliales. Ces cellules ne sont pas capables de phagocyter des micro-organismes comme dans le cas des cellules phagocytaires professionnelles. Dans ces cellules, le processus de phagocytose est essentiellement impliqué dans le maintien de l'homéostasie et est dirigé contre les débris cellulaires résultants de phénomènes d'apoptose ou de nécrose.

Les cellulaires phagocytaires professionnelles sont recrutées vers les zones contenant les éléments à phagocyter par des facteurs chimiotactiques de natures diverses, telles que les composants du système du complément C3a et C5a, l'IL-8 ou MCP1 (pour Monocyte Chemoattractant Protein 1). La reconnaissance des éléments à phagocyter se fait grâce à la détection de ligands spécifiques à leur surface, parfois appelé signal « eat-me » (**Figure 20**) (Cockram *et al.*, 2021). Il peut s'agir soit de molécules provenant directement des éléments à phagocyter, soit de molécules ayant recouvert la surface de ces éléments et favorisant leurs phagocytoses (processus d'osponisation).

L'ADN et les histones associées constituent des exemples de signaux directs d'induction de la phagocytose, permettant l'élimination de vésicules nécrotiques exposant ces molécules à leur surface. De même, les annexines et la calreticuline, normalement présentes dans le



**Figure 20 :** Exemples de récepteurs des cellules phagocytaires impliqués dans la détection des opsonines et des signaux « eat-me » présents à la surface des cellules à phagocyter (Cokram *et al.*, 2021).



**Figure 21 :** Exemples de signaux « don't eat me » et récepteurs associés exprimés à la surface des phagocytes (Cokram *et al.*, 2021).

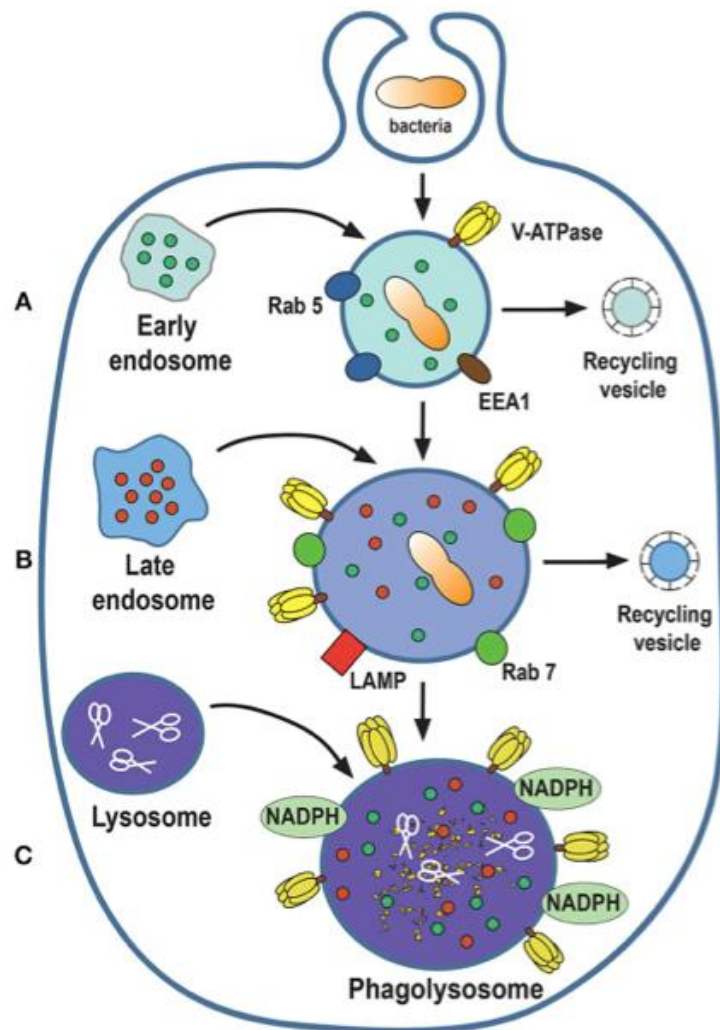
réticulum endoplasmique (RE), peuvent se retrouver à la surface des corps apoptotiques et induire la phagocytose. L'infection de cellules par des pathogènes intra-cellulaires peut aussi provoquer une augmentation du nombre de signaux « eat-me » à la surface de ces cellules infectées, induisant leur élimination par phagocytose. C'est le cas lors de l'infection par la bactérie pathogène *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose, dont l'internalisation provoque une augmentation de la calréticuline à la surface des cellules infectées, ce qui facilite leur élimination par les macrophages.

Les PRR des cellules phagocytaires professionnelles jouent bien sûr un rôle important dans la reconnaissance directe des micro-organismes à phagocyter.

Dans le cas d'une détection indirecte, les molécules recouvrant les éléments à phagocyter (aussi appelées opsonines), sont généralement des effecteurs du système immunitaire. Les anticorps et certains dérivés du système du complément (fragment C3b) jouent en particulier un rôle important dans l'opsonisation. Ces effecteurs sont détectés par les macrophages grâce à des récepteurs spécifiques comme les récepteur Fc $\gamma$ R (fixant le domaine Fc des immunoglobulines de types G) ou le récepteur C3b (CR1). Des molécules comme les annexines ou la calréticuline, présents à la membrane de cellules, existent également sous forme de facteurs solubles et peuvent aussi jouer le rôle d'opsonines (**Figure 20**).

A l'inverse de ces signaux « eat me », il existe des signaux « don't eat me » émis par la majorité des cellules qui inhibent la phagocytose et permettent de prévenir la destruction des cellules saines (Cockram *et al.*, 2021). Cette régulation de la phagocytose est le fait de protéines présentes à la surface des cellules, tel le CMH de classe I ou le récepteur CD47, ou sécrétées, comme l'adénosine (**Figure 21**). Il existe également des protéines extracellulaires sécrétées qui sont appelées « opsonines négatives », recouvrant et masquant certains signaux « eat me » comme les phosphatidyl-sérines, ou « suppresseurs de phagocytose », qui se lient aux phagocytes et l'inhibe. Ces mécanismes inhibiteurs ont essentiellement été mis en évidence *in vitro* et le rôle physiologique de ces opsonines inhibitrices n'est pas encore bien compris (Cockram *et al.*, 2021).

La détection (directe ou indirecte) d'un élément à phagocyter induit un remodelage du cytosquelette d'actine de la cellule phagocytaire et l'extension de la membrane plasmique autour de la cible jusqu'à l'entourer complètement.



**Figure 22** : Etapes de maturation du phagolysosome lors de la phagocytose. A) Les phagosomes, contenant le corps étranger endocyté, fusionnent avec des endosomes précoces présentant la protéine Rab5 à leur surface. Le phagosome va ensuite mûrir en fusionnant avec des vésicules intra-cellulaires, augmentant le nombre de V-ATPases membranaires et provoquant l'acidification du milieu intra-endosomal. B) Les protéines Rab5 disparaissent à la surface de l'endosome et sont remplacées par les protéines Rab7, caractéristiques des endosomes tardifs. C) Le phagosome va finalement fusionner avec des lysosomes contenant de nombreuses enzymes de dégradation pour former un phagolysosome où la dégradation du corps étranger a lieu. Tout au long du processus des fragments de membranes endosomales sont extrudées de l'endosomes pour être recyclées (Uribe-Querol et Rosales, 2020).

La tension exercée sur la membrane plasmique va conduire à l'internalisation du corps phagocyté, maintenant entouré de membrane plasmique. La vacuole ainsi formée est appelée phagosome (Uribe-Querol et Rosales, 2020) (**Figure 22**).

### II.I.3 Elimination des pathogènes phagocytés

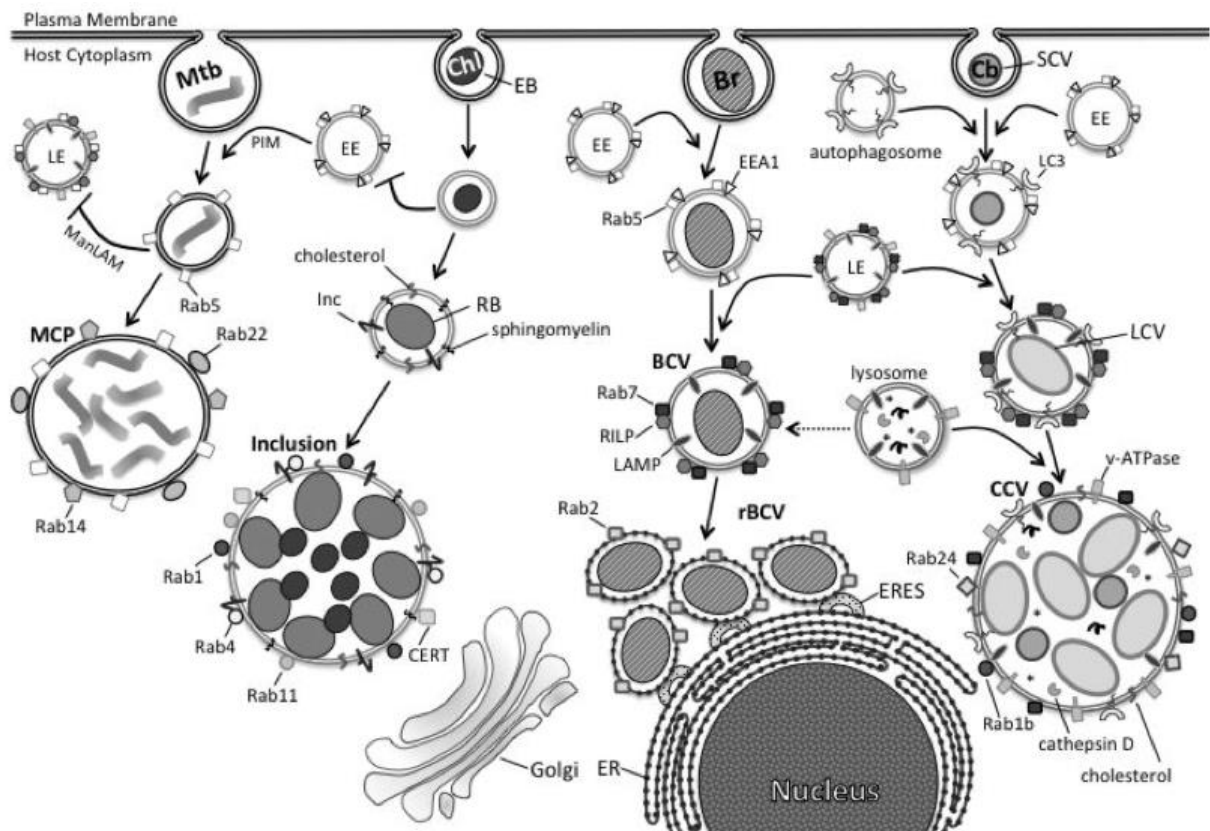
Le phagosome, une fois formé, va évoluer en fusionnant avec d'autres compartiments intracellulaires. Le volume total du phagosome n'augmente pas car il y a, de manière simultanée, une élimination de fragments de membrane qui sont recyclés (**Figure 22**).

La fusion du phagosome avec des endosomes apporte un nombre plus important de V-ATPase à la surface de celui-ci. Les V-ATPases sont des pompes à protons qui vont permettre d'acidifier le contenu du phagosome en y faisant entrer des ions  $H^+$  (le pH pouvant atteindre 4,5). Le phagosome est initialement décoré par des protéines Rab5 à sa surface. Il s'agit de GTPases qui vont permettre le recrutement d'EEA1 (Early Endosome Antigène 1), puis de Rab7 et de LAMP (Lysosomal-Associated Proteins) (Uribe-Querol et Rosales, 2020) (**Figure 22**).

Le phagosome va alors fusionner avec des lysosomes, notamment grâce aux protéines Rab7, pour former le phagolysosome. Les complexes NADPH oxydase, présents au niveau du phagolysosome, vont permettre la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) qui vont réagir et inactiver les composants phagocytés. Le déversement de diverses enzymes, telles que des cathepsines, des protéases, des lipases et le lysozyme, permet également d'assurer la dégradation des éléments phagocytés.

## II.II Pathogènes utilisant la phagocytose comme moyen d'entrée dans la cellule

Si la phagocytose est un mécanisme qui a pour vocation de défendre l'organisme vis-à-vis des bactéries pathogènes, certaines d'entre elles ont développé au cours de l'évolution des stratégies visant à détourner ce processus à leur avantage. L'entrée d'un pathogène dans une cellule lui confère en effet plusieurs avantages tels que la protection vis à vis du système immunitaire circulant et un accès aux ressources métaboliques intracellulaires.



**Figure 23 : Internalisation et mécanismes de survie de pathogènes dans les macrophages.**

Une fois phagocytée, *Chlamydia* (Chl) empêche bloquer la fusion du phagosome avec des endosomes précoces. La vacuole contenant Chl incorpore ensuite des éléments du Golgi pour former un compartiment nommé « inclusion », qui ne fusionnera pas avec les lysosomes, et dans lequel la bactérie se réplique. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) inhibe, elle, la maturation du phagosome plus tardivement en empêchant sa fusion avec les endosomes tardifs. *Brucella* (Br) et *Coxiella burnetii* (Cb) agissent encore plus tardivement en tolérant une maturation du phagosome jusqu'au stade de phagolysosome, car leur réplique nécessite des conditions acides (Case et Samuel, 2016).

Les bactéries intracellulaires résistent d'autre part plus facilement à certains traitements antibiotiques si ces derniers diffusent mal à travers les membranes plasmiques.

Certains pathogènes ont acquis la capacité de survivre dans les cellules phagocytaires, une fois internalisés. Les deux principaux moyens d'échapper à la lyse cellulaire, une fois capturé dans un phagolysosome, sont soit de s'échapper de ce compartiment pour accéder librement au cytosol, soit de modifier ce compartiment de manière à rendre la survie à l'intérieur possible. Les bactéries intracellulaires peuvent ainsi être séparées en deux catégories distinctes selon leur modalité de vie intracellulaire, intra-vacuolaire ou « libre » dans le cytosol.

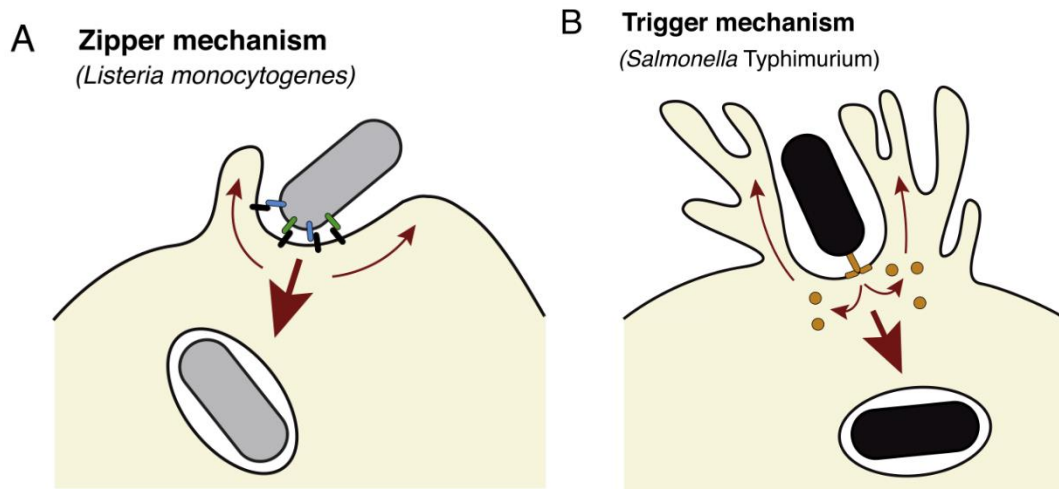
A titre d'exemple de bactéries intra-vacuolaires, nous pouvons citer les bactéries des genres *Chlamydia* ou *Brucella* (Case et Samuel, 2016) (**Figure 23**). Chacune emploie un mécanisme différent.

*Chlamydia* modifie le phagosome dès le début de son entrée en recrutant les microtubules de l'hôte, en altérant la composition lipidique de la vacuole et en recrutant des protéines Rab autres que Rab5 et 7. *Chlamydia* se constitue ainsi un compartiment vacuolaire appelé « inclusion » qui ne fusionnera ni avec les endosomes ni les lysosomes. La bactérie peut alors se développer à l'intérieur de la vacuole, sans craindre d'être dégradé.

*Brucella*, une fois phagocytée, ne modifie que tardivement la vacuole dans laquelle elle réside. Un certain nombre de facteurs de virulence de *Brucella* nécessite en effet un pH acide. Cette bactérie se maintient dans le phagosome jusqu'à l'étape du phagolysosome. *Brucella* possède de nombreux gènes impliqués dans la résistance vis-à-vis des ROS, des RNS et des enzymes de dégradation déversées dans le phagolysosome. La résistance à ces mécanismes de destruction n'est cependant que partielle puisque près de 90% des bactéries sont détruites. Les 10% survivantes induisent une fusion du phagolysosome qui les contient avec le réticulum endoplasmique pour donner naissance à un nouveau compartiment où la multiplication de *Brucella* va pouvoir s'effectuer (Wells *et al.*, 2022).

A titre d'exemple de bactérie se retrouvant « libres » dans le cytosol, nous pouvons citer l'exemple de *Mycobacterium tuberculosis*. Cette bactérie est capable à la fois de survivre dans la phagosome mais est également capable de s'en échapper. Ceci illustre que ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs. (BoseDasgupta et Pieters, 2018). Les bactéries ayant un cycle de vie intra-cellulaire cytosolique incluent également les bactéries *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica* (voir ci-dessous).





**Figure 24 : Internalisation de bactéries pathogènes dans les cellules non-phagocytaires.** Deux grands modèles ont été décrits pour l’internalisation de pathogènes au sein des cellules non-phagocytaires : A) le mécanisme « Zipper », où des récepteurs à la surface de la cellule reconnaissent des ligands à la surface de la bactérie, et B) le mécanisme « Trigger », où des molécules appelées effecteurs sont injectées dans la cellule hôte. Dans les deux cas le remodelage du cytosquelette d’actine de la cellule hôte aboutit à l’internalisation de la bactérie (Ribet et Cossart, 2015).

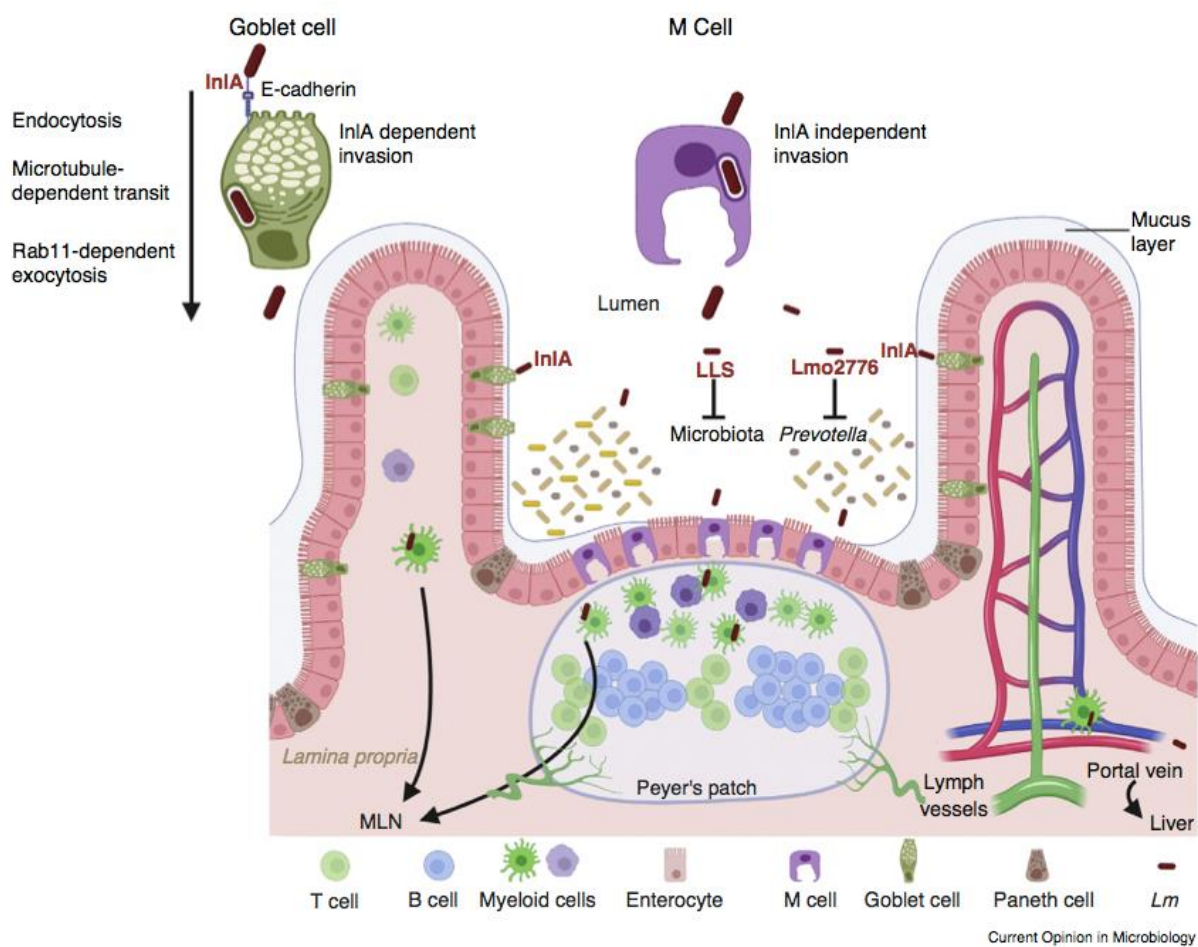
## II.III Mécanismes d'internalisation de bactéries dans les cellules non-phagocytaires

Un certain nombre de pathogènes sont capables de pénétrer dans des cellules non phagocytaires comme les cellules épithéliales. L'étude de la capacité d'internalisation de ces pathogènes dans des cellules non phagocytaires a permis de mettre en évidence deux mécanismes d'entrée principaux, appelés mécanismes « Zipper » et « Trigger » (Ribet et Cossart, 2015). Ces deux mécanismes impliquent une modification du cytosquelette d'actine de la cellule hôte.

Le mécanisme « Zipper » (**Figure 24.A**), repose sur la formation de multiples points d'adhésion entre la membrane plasmique de la cellule eucaryote et la surface de la bactérie. C'est l'aspect de ces liaisons multiples entre les protéines bactériennes et eucaryotes qui, faisant penser à une fermeture éclair, a donné son nom à ce mécanisme. Lorsque les contacts ont été établis avec l'ensemble de la surface de la bactérie, celle-ci se retrouve, de fait, entourée par la membrane plasmique de la cellule eucaryote et ainsi internalisée. L'organisme modèle pour l'étude de ce mécanisme est *Listeria monocytogenes*. Le mécanisme « Trigger » (**Figure 24.B**) repose sur l'injection de molécules bactériennes appelées « effecteurs » à l'intérieur de la cellule eucaryote, la plupart du temps via un système de sécrétion de type 3 (ou T3SS pour Type 3 Secretion System). Le T3SS est constitué de protéines formant une structure évoquant une seringue par laquelle des molécules bactériennes vont être injectées directement dans le cytosol d'une cellule eucaryote (Pinaud *et al.*, 2018). Ces effecteurs ciblent la membrane plasmique de la cellule et induisent la formation de structures de type « ruffles ». Ces dernières vont recouvrir la bactérie, entraînant ainsi son internalisation dans la cellule. L'organisme modèle pour l'étude de ce mécanisme est *Salmonella enterica* Typhimurium.

### II.III.1 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* est un bacille de type gram positif appartenant au phylum des *Bacillota*, non sporulée et anaérobie facultative. Présente de manière ubiquitaire dans l'environnement, elle est responsable de la listériose qui est la seconde cause de mortalité par intoxication alimentaire en France (environ 65 morts/an, Cauteren *et al.*, 2018) (10 à 24% de mortalité aux USA en fonction de l'existence de comorbidités ; Rogalla et Bomar, 2022).

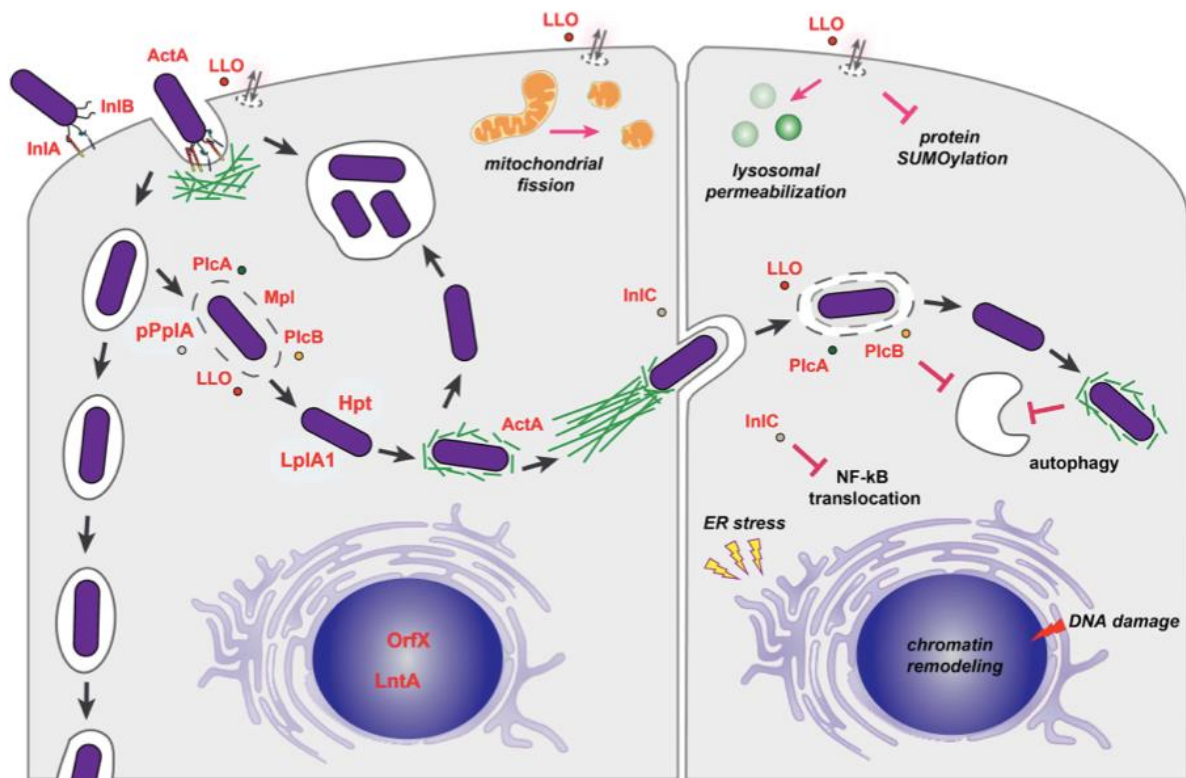


**Figure 25 : Mécanismes de franchissement de la barrière intestinale par *L. monocytogenes*.** *L. monocytogenes* est capable de franchir la barrière intestinale par deux mécanismes majeurs : une voie inlA-dépendante et une voie inlA-indépendante. L'entrée via l'interaction InlA-E-cadhérine a principalement lieu au niveau des cellules caliciformes. La deuxième voie principale se fait via les cellules M. Celles-ci captent *L. monocytogenes*, et permettent une entrée InlA-indépendante dans le tissu lymphoïde. La capacité de *L. monocytogenes* à survivre à la lyse par les cellules phagocytaires lui permet ensuite de se propager. Une fois passé du côté basal de l'épithélium, *Listeria* peut s'internaliser dans les entérocytes (via les E-cadhérines présentes au pôle basal) ou rejoindre la circulation et se propager dans l'ensemble de l'organisme (Kammoun *et al.*, 2022).

Chez l'Homme, l'ingestion d'aliments contaminés par cette bactérie peut provoquer des gastroentérites et entraîner des septicémies et des atteintes du système nerveux central chez certains sujets à risque, ainsi que des avortements et des infections péri-natales chez les femmes enceintes. *Listeria* est un pathogène intracellulaire facultatif, ayant la capacité d'envahir les cellules non phagocytaires de l'hôte (**Figure 25**), de s'y répliquer, et ainsi de coloniser efficacement l'organisme infecté en franchissant les barrières intestinales, placentaires et hémato-encéphaliques.

L'internalisation de *L. monocytogenes* dans des cellules non phagocytaires se fait via le mécanisme de type « Zipper » (Les protéines de surface internaline (Inl)A et InlB vont se lier aux protéines d'adhésion E-Cadhérine et au récepteur membranaire Met, respectivement (Lecuit *et al.*, 1999 ; Shen *et al.*, 2000). Ces liaisons vont conduire à un remodelage du cytosquelette d'actine de la cellule eucaryote et à l'internalisation de la bactérie à l'intérieur d'une vacuole. L'implication de ces différentes internalines dans le processus d'internalisation va évidemment dépendre de la présence ou non de leurs récepteurs respectifs à la surface des cellules. Au niveau de l'épithélium intestinal, InlA va être impliquée dans l'entrée de la bactérie au sein des entérocytes. Cette entrée peut s'effectuer à l'extrémité des villosités, au niveau où les entérocytes « âgés » se détachent de l'épithélium pour être remplacé par les entérocytes « jeunes » sous-jacents. Cette partie du processus de renouvellement de l'épithélium intestinal permet d'exposer des E-cadhérines libres, alors que celles-ci sont d'ordinaire situées dans les parties latérales et basales de la cellule et engagées dans la formation des jonctions adhérentes entre les cellules épithéliales (Pentecost *et al.*, 2010). D'autre part, les cellules caliciformes, particulièrement celles venant de libérer leur mucus, présente des E-cadhérines accessibles à leur surface. Il a été montré que ces cellules caliciformes étaient un point d'entrée privilégié dans la cellule de *L. monocytogenes* via l'interaction entre InlA et les E-cadhérines (Nikitas *et al.*, 2011).

La liaison InlB-Met va, elle, activer les complexes de régulation WAVE (WRC) qui vont à leur tour recruter le complexe Arp2/3. Ce dernier induit un remodelage des filaments d'actine de la cellule hôte (Pizzaro-Cerda *et al.*, 2016). La fixation d'InlB sur son récepteur Met peut d'autre part avoir un effet synergique avec l'entrée InlA-dépendante, en favorisant l'internalisation via l'augmentation de l'endocytose des E-cadhérines (Pentecost *et al.*, 2010).



**Figure 26 : Devenir de *L. monocytogenes* après internalisation.** Dans les cellules caliciformes, *L. monocytogenes* est internalisée dans une vacuole migrant jusqu’au pôle basal de la cellule, lui permettant ainsi de franchir la barrière épithéliale intestinale (translocation). Dans d’autres types cellulaires, *Listeria* peut s’échapper de sa vacuole via différents facteurs, notamment la LLO et les phospholipase PlcA et PlcB. Dans le cytosol, elle est capable d’utiliser les métabolites produits par la cellule hôte. Elle peut par la suite former une queue d’actine via la protéine ActA, lui permettant ainsi de se propager aux cellules voisines. Il a également été observé que *Listeria* pouvait se maintenir pendant plusieurs heures dans des vacuoles dérivées de la vacuole d’internalisation et s’y multiplier (Pizzaro-cerda, 2018).

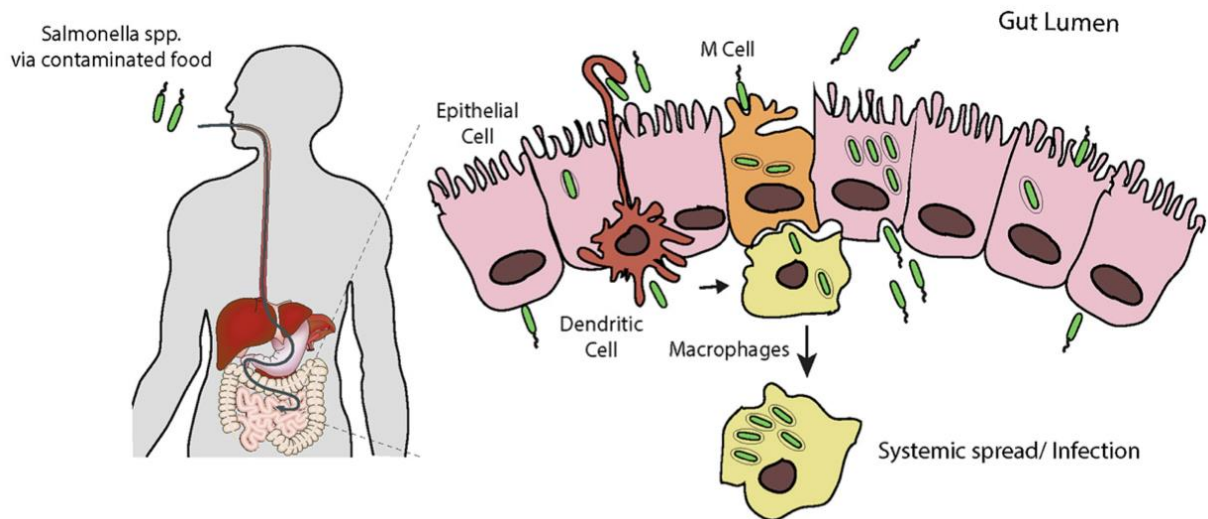
L'utilisation de mutants de délétion  $\Delta inlB$  a montré que cette internaline n'était pas indispensable pour l'entrée de *Listeria* dans les entérocytes, alors sa présence est nécessaire pour l'entrée dans les cellules de rate ou du foie (Da Silva, 2012).

Suite à son entrée dans les cellules hôte, *L. monocytogenes* est capable de s'échapper de la vacuole d'internalisation. Ce mécanisme permet notamment à la bactérie d'échapper à la destruction via la fusion de sa vacuole d'internalisation avec des compartiments lysosomaux (comme dans le cas des macrophages). La bactérie, une fois dans le cytosol, va d'autre part pouvoir bénéficier de certains métabolites produits par la cellule. L'échappement de la vacuole est principalement possible par la sécrétion de phospholipases (PlcA et PlcB) ainsi que d'une toxine, nommée lystériolysine O (LLO), créant des pores dans la membrane des vacuoles d'internalisation et conduisant à la libération de la bactérie dans le cytosol (Gedde *et al.*, 2000). Il est à noter que la LLO a également une implication dans le passage de cellules en cellules (Osborne et Brumell, 2017).

Une fois libre dans le cytosol, *L. monocytogenes* exprime une protéine de surface nommée ActA qui va entraîner la formation de filaments d'actine via le recrutement du complexe Arp2/3 à une extrémité de la bactérie. La « queue » d'actine ainsi formée va permettre de propulser *Listeria* à travers la cellule hôte et favoriser ainsi le passage de la bactérie dans une cellule adjacente (**Figure 26**). Cette mobilité permet à *L. monocytogenes* d'échapper à la xenophagie (un type particulier d'autophagie ciblant particulièrement les bactéries dans le cytosol ; voir ci-dessous). *L. monocytogenes* utilise notamment ce mécanisme pour envahir les entérocytes après être entré dans les cellules de type M (Rey *et al.*, 2020).

### II.III.2 *Salmonella enterica*

*Salmonella enterica* est une bactérie de type Gram négatif, appartenant au phylum des *Pseudomonadota*. Parmi plus de 2600 sérovars, *S. Typhi* et *S. Typhimurium* constituent des agents pathogènes majeur causant respectivement la fièvre typhoïde et la salmonellose (caractérisée par des gastro-entérites), qui est la première cause de décès par intoxication alimentaire en France (environ 67 morts/an, Cauteren *et al.*, 2018). Dans le cas de *S. Typhimurium*, c'est ainsi près 110 millions de cas de gastro-entérites par an (Ménard *et al.*, 2022). L'infection survient généralement par l'ingestion de produits alimentaires, notamment les œufs, les volailles, les légumes ou la consommation d'eau souillée par des fèces. Dans le cas de personnes au système immunitaire diminué, la salmonellose peut être fatale.



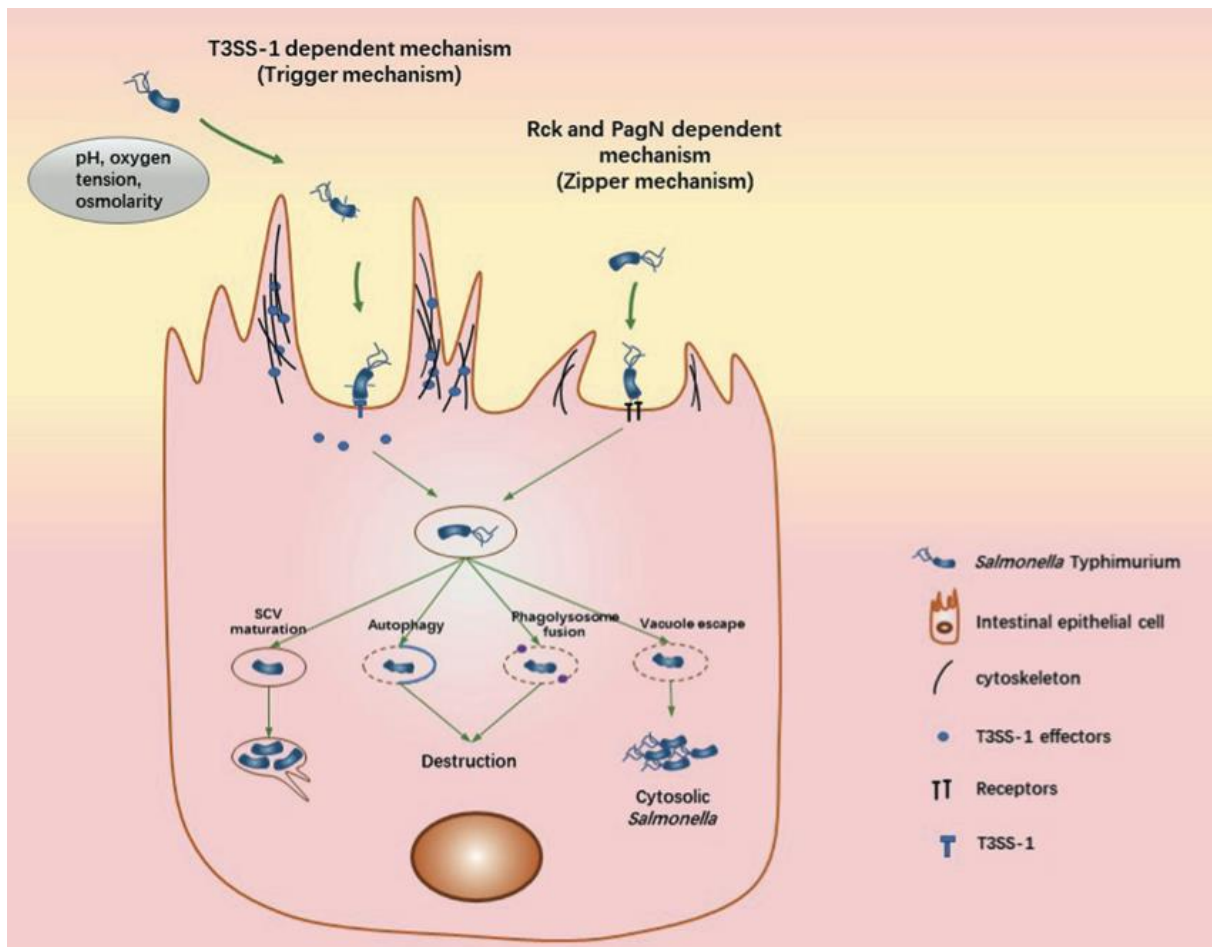
**Figure 27** : Entrée de *S. Typhimurium* dans l'organisme. Les contaminations par *Salmonella* se produisent principalement par ingestion d'aliments contaminés. Une fois dans l'intestin, *S. Typhimurium* traverse la barrière intestinale par plusieurs mécanismes : soit via les cellules dendritiques ou les cellules M, qui captent la bactérie dans la lumière intestinale, soit via l'internalisation de *Salmonella* dans les entérocytes (Hume *et al.*, 2017).

Une fois dans l'intestin, *S. Typhimurium* est capable de pénétrer à l'intérieur de différents types cellulaires de l'épithélium intestinal : les entérocytes, les cellules M et les cellules dendritiques (Li, 2022) (**Figure 27**). Dans le cas des cellules non phagocytaires de l'épithélium intestinal, comme les entérocytes, l'entrée de *S. Typhimurium* s'effectue par un mécanisme de type « Trigger » (**Figure 28**). L'ensemble du T3SS et des effecteurs qui seront sécrétés dans la cellule sont codés par des gènes présents sur un îlot de pathogénicité appelé Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI1). Les principaux effecteurs injectés par le système de sécrétion T3SS (SopB, SopE, SopE2, SipA et SipC) ont une action sur le cytosquelette d'actine de l'hôte (Hume *et al.*, 2017). A l'instar de la cascade de signalisation induite lors de la reconnaissance InlB–Met dans le cas de *Listeria monocytogenes*, l'ensemble des effecteurs de *S. Typhimurium* conduit au recrutement des WRC (Bisi *et al.*, 2013), à l'activation du complexe Arp 2/3 et à la formation de « ruffles » par remodelage des filaments d'actine sous-membranaires. Les « ruffles » ainsi formées permettent l'internalisation de la bactérie.

En parallèle de cette voie principale, il a été montré que *Salmonella* était capable de s'internaliser dans des fibroblastes par l'activation d'un autre complexe que WAVE, à savoir le complexe WASH (Wiskott-Aldrich syndrome protein and Scar Homologue ; Hanisch *et al.*, 2010). Si ce complexe implique également la voie Arp 2/3, d'autres facteurs indépendants de Arp2/3, comme la myosine (Hanisch *et al.*, 2011) ou la villine (Lhocine *et al.*, 2015) peuvent intervenir.

D'autre part, il a été montré que *S. Typhimurium* possède également la capacité de s'internaliser par un mécanisme de type « Zipper », indépendant du système SPI1 (et donc du T3SS). Cette internalisation impliquerait les protéines de surface Rck et PagN, qui se lieraient au récepteur du facteur EGF (Epithelial Growth Factor ; Mambu *et al.*, 2020) et aux intégrines  $\beta$  (Barilleau *et al.*, 2021) respectivement (**Figure 29**). Ainsi, dans certains types cellulaires, et notamment au niveau intestinal où l'EGFR et les intégrines  $\beta$  sont exprimés au niveau basolatéral des entérocytes, *S. Typhimurium* pourrait s'internaliser via un mécanisme de type « Zipper », illustrant que les deux types de mécanismes peuvent coexister chez une même bactérie.





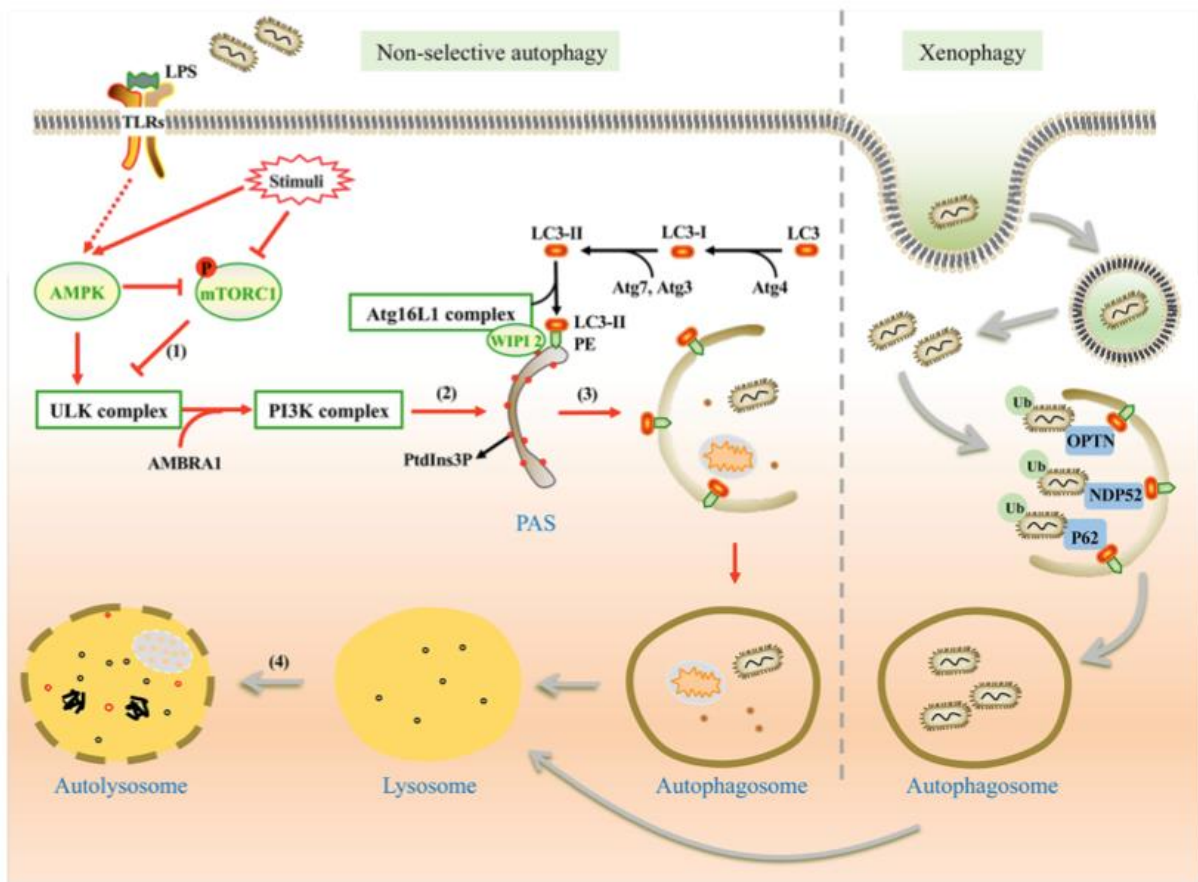
**Figure 29 : Mécanisme d’internalisation et de survie de *S. Typhimurium* dans les cellules eucaryotes.** *S. Typhimurium* peut s’internaliser en utilisant des mécanismes de type « Trigger » et « Zipper ». Le mécanisme « Trigger » est le mieux caractérisé pour *S. Typhimurium* et implique l’injection d’effecteurs via un système de sécrétion de de type 3 (T3SS). Ces effecteurs entraînent la polymérisation de l’actine permettant l’entrée de *S. Typhimurium* dans la cellule. *Salmonella* reste dans sa vacuole d’internalisation (renommée alors SCV pour Salmonella Containing Vacuole), où elle peut proliférer. La cellule peut éventuellement détruire le contenu de ces vacuoles par des mécanismes de type autophagie/fusion avec des lysosomes. Un certain nombre de *S. Typhimurium* sont capables de s’échapper de leur vacuole d’internalisation et de proliférer dans la cellule une fois libres dans le cytosol. Le mécanisme « Zipper » chez *S. Typhimurium* repose sur les protéines Rck et PagN, qui interagissent avec le récepteur du facteur EGF et les intégrines. Les liaisons ligands-récepteurs ainsi générées entraînent un réarrangement du cytosquelette d’actine conduisant à l’internalisation de *S. Typhimurium* (Ménard *et al.*, 2022).

### II.III.3 L'autophagie

Les bactéries pathogènes s'étant internalisées dans des cellules non phagocytaires et s'étant échappées de la vacuole d'internalisation peuvent être ciblées par un mécanisme de défense intrinsèque des cellules eucaryotes, l'autophagie.

L'autophagie est le processus par lequel une cellule renouvelle ses constituants. Elle peut également permettre de dégrader des corps étrangers présents dans la cellule comme des bactéries intra-cellulaires. On distingue trois types d'autophagie, la macroautophagie, la microautophagie, et l'autophagie médiée par les chaperonnes. La macroautophagie est la forme la plus étudiée. Le terme autophagie est fréquemment utilisé pour désigner uniquement la macroautophagie et il sera fait de même ici. L'autophagie survient généralement suite à un stress de la cellule, notamment une carence en nutriments. Elle permet de dégrader des macromolécules ou même des compartiments intracellulaires comme les mitochondries, pour récupérer des éléments de base qui seront utilisés dans la synthèse de nouvelles protéines ou structures répondant aux besoins occasionnés par les stress subis par la cellule (Mizushima et Komatsu, 2011). L'autophagie peut être sélective ou non sélective. Les éléments cibles de l'autophagie sélective sont appelés couramment « cargos ». L'autophagie sélective repose sur l'existence de récepteurs appelés SLR (Sequestosome-Like Receptors) reconnaissant des motifs particuliers sur les cargos à dégrader. L'ubiquitine est l'un de ces motifs particuliers. Il s'agit d'une protéine de 76 acides aminés, qui se lie de façon covalente à un substrat. L'ubiquitine est reconnue par l'autophagosome et induit la destruction ciblée de éléments ainsi « marqués ». Le mécanisme de l'autophagie ressemble à celui de la phagocytose (**Figure 30**). Il y a ainsi formation d'une membrane autour d'une portion du cytoplasme contenant les éléments à dégrader. Une différence notable est la présence d'une double membrane dans le cas de l'autophagie. Cette structure est appelée autophagosome. Cet autophagosome va ensuite fusionner avec des lysosomes aboutissant ainsi à la dégradation des composés initialement ciblés par l'autophagie (Chang *et al.*, 2021).

Dans le cas où l'autophagie est dirigée contre des corps étrangers (comme des bactéries intracellulaires, par exemple), on parle de « xénophagie ». Il s'agit d'une autophagie sélective où les principaux SLR sont p62, NDP52 et les optineurines. Ces récepteurs font le lien entre les molécules d'ubiquitines recouvrant les bactéries intracellulaires et la protéine LC3 (microtubule associated protein light chain 3), qui est un composé essentiel pour la formation de l'autophagosome (**Figure 30**) (Ravenhill *et al.*, 2019).



**Figure 30 : Mécanismes de l'autophagie non sélective et de la xénophagie de bactéries intracellulaires.** Dans l'autophagie non sélective, la reconnaissance de LPS bactérien induit : 1) l'activation de l'AMPK et l'inhibition de la voie mTORC1. Ceci active le complexe ULK1 et phosphoryle le complexe PI3K. 2) WIPI2 recrute le complexe Atg16L1 pour former le pré-autophagosome. 3) La membrane en formation s'étend autour d'une portion du cytoplasme (contenant potentiellement des bactéries intracellulaires). 4) l'autophagosome fusionne avec les lysosomes pour dégrader les éléments « capturés ». Dans le cas de la xénophagie, des protéines adaptatrices, comme p62, les optineurines (OPTN) et NDP52, permettent de cibler bactéries marquées par l'ubiquitine, qui se retrouvent alors entourées par un autophagosome et dégradées, suite à la fusion de ce compartiment avec les lysosomes (Kang *et al.*, 2022).

#### II.III.4 Bactéries du microbiote intestinal et capacité d'internalisation dans les cellules épithéliales

Les bactéries du microbiote (intestinal, cutané ou autre) sont généralement considérées comme « associées » à la peau ou aux muqueuses, mais toujours en restant strictement « extracellulaires ». Plusieurs études suggèrent cependant que certaines bactéries du microbiote, qui ne sont pas considérées comme des pathogènes « professionnels », puissent s'internaliser dans des cellules épithéliales non phagocytaires.

*Porphyromonas gingivalis*, une bactérie de type Gram négatif, anaérobie, non sporulée et appartenant au microbiote buccal, est connue pour être un pathogène opportuniste majeur dans la survenue de gingivite. Cette bactérie est capable de s'internaliser dans une grande variété de cellules (Pan *et al.*, 2017). Les mécanismes de cette internalisation sont encore mal compris mais impliqueraient probablement les fimbriae, de courts filaments protéiques impliqués dans les phénomènes d'adhésions bactériennes. *P. gingivatis* pourrait ainsi se lier à des intégrines des cellules eucaryotes ce qui induirait son internalisation de la bactérie par un mécanisme de type « Zipper ». Cette internalisation impliquerait notamment les filaments d'actines, les microtubules et les radeaux lipidiques des cellules de l'épithélium buccal (Mysak *et al.*, 2014). Une fois internalisée, la bactérie est ciblée par l'autophagie, mais cette dernière possède divers mécanismes lui permettant d'éviter ces mécanismes de dégradation (Kang *et al.*, 2022).

Le genre *Fusobacterium* appartient au phylum des *Fusobacteriota* et est constitué de bactéries de type Gram négatif, anaérobies et non sporulées. Ces bactéries sont présentes dans le microbiotes oral et intestinal (Lee *et al.*, 2022). *F. nucleatum*, *F. necrophorum* et *F. varium* ont été associés à diverses pathologies intestinales, telles que la maladie de Crohn et le cancer colorectal pour *F. nucleatum*, et la rectocolite hémorragique pour *F. varium*. *F. nucleatum* et *F. varium* sont capable de s'internaliser dans les cellules épithéliales humaine (Okhusa *et al.*, 2009) ainsi que les dans fibroblastes et les cellules endothéliales pour *F. nucleatum* (Dabja-Wolter *et al.*, 2009 ; Fardini *et al.*, 2011). Le mécanisme d'entrée est encore méconnu. Seul la protéine FadA a été identifiée comme se liant aux cadhérines des cellules cibles, favorisant l'adhésion et l'internalisation de la bactérie. Dans le cas de *F. nucleatum*, il a également été mis en évidence que cette bactérie pouvait entraîner l'internalisation d'autre bactéries non invasives, telle que *Streptococcus cristatus*, au sein de cellule épithéliales (Edwards *et al.*, 2006).





Ces différents résultats suggèrent donc que des bactéries présentes dans différents types de microbiotes chez l'homme possèdent la capacité s'internaliser dans des cellules non phagocytaires. L'impact de l'internalisation de ces bactéries sur la physiologie des épithéliums ciblés reste encore indéterminé.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons identifié deux familles de bactéries appartenant au microbiote intestinal et possédant potentiellement la capacité de s'internaliser dans les entérocytes : les *Staphylococcus* et les *Lactobacillus*.

### III. Les Staphylocoques et les Lactobacilles

#### III.I Les Staphylocoques

Le genre *Staphylococcus* contient 63 espèces à ce jour (LPSN Octobre 2022 : Parte *et al.*, 2020). Il s'agit de bactéries de type Gram positif, non sporulées, aérobies-anaérobies facultatives, présentent dans une grande variété d'environnements. De nombreuses espèces de *Staphylococcus* appartiennent au microbiote cutané humain. Ces bactéries sont traditionnellement classées en deux grands groupes, dépendant de la présence d'une activité de type coagulase ou non. Le groupe des bactéries « positives pour la coagulase » (ou CoPS pour Coagulase positive Staphylococci) contient 8 espèces, toutes pathogènes opportunistes. Les autres espèces appartiennent au groupe des bactéries « négatives pour la coagulase » (ou CoNS pour Coagulase negative Staphylococci). La réalité est en fait un peu plus complexe car certaines espèces comme *S. hyicus* et *S. agnetis* expriment une activité coagulase dépendante du temps ou de la souche et sont donc difficiles à classer.

On ajoute parfois par conséquent un groupe à « coagulase variable » incluant ces deux genres (Kosecka-Strojek *et al.*, 2018). Le groupe CoPS était autrefois associé à la notion de pathogène, alors que le groupe CoNS était essentiellement vu comme regroupant des bactéries non pathogènes. Aujourd'hui, de plus en plus d'études ont montré l'implication de CoNS dans la survenue de pathologies (Becker *et al.*, 2014). L'intérêt porté à la famille des *Staphylococcus* est fortement lié l'abondance des espèces CoPS et CoNS dans le milieu hospitalier et à l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, notamment les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (MRSA) (Turner *et al.*, 2019).





Plusieurs espèces de *Staphylococcus* possèdent la capacité de s'internaliser dans des cellules hôtes non phagocytaires. Cette internalisation permet aux bactéries de se protéger des antibiotiques et entraîne un risque accru d'apparition de résistance aux antibiotiques (Magrys *et al.*, 2018).

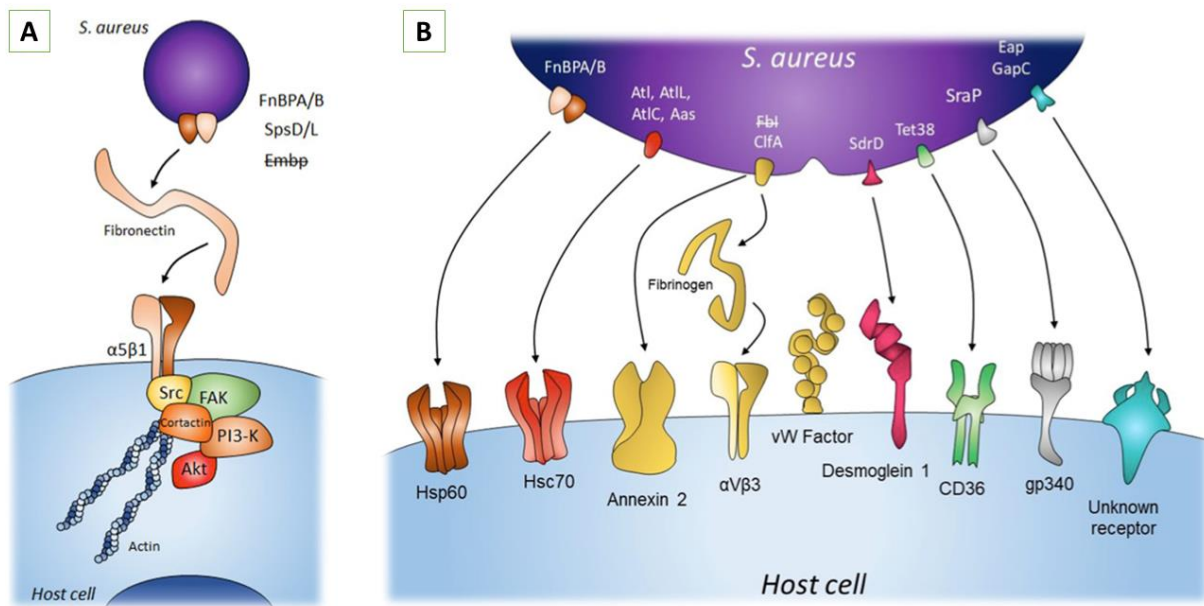
### III.I.1 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est l'espèce la plus étudiée du genre *Staphylococcus*. Il existe un portage « sains » de cette bactérie de manière pérenne par environ 25% de la population et de manière transitoire par environ 70%, en particulier au niveau des fosses nasales (van Belkum *et al.*, 2009). Il s'agit d'une bactérie pathogène opportuniste impliquée dans un grand nombre de pathologies. En particulier, *S. aureus* est impliquée dans des maladies cutanées telles que la dermatite atopique et est également le principal agent d'infections nosocomiales. *S. aureus* possède une diversité importante de facteurs de virulence, dont de nombreuses toxines (Ahmad-Mansour *et al.*, 2021) :

- des toxines formant des pores : cette famille inclut les hémolysines qui affectent un large spectre de cellules, la toxine Panton-Valentine leukocidine (PVL) qui cible les leucocytes, les « Modulines solubles dans le phénol » (PSM), qui ont un large champ d'action, et les exotoxines inhibitrices de la différenciation des cellules de l'épiderme.

- les toxines exfoliatives : il s'agit de toxines causant l'apparition de pustules et de cloques essentiellement chez les nouveau-nés. Ces toxines ont une activité de type sérine-protéase qui cible la Desmogleïne 1, une protéine des desmosomes, entraînant le détachement des cellules épithéliales superficielles de la peau (Bukowski *et al.*, 2010).

- des toxines à activité de type « superantigène » : les toxines de cette famille se lient au CMH de classe II des lymphocytes T, entraînant une activation de ces derniers qui peut être jusqu'à 300 000 fois supérieure à l'activation survenant lors d'une réponse immunitaire adaptative classique (Deacy *et al.*, 2021). Les cascades inflammatoires résultantes peuvent aboutir à des dysfonctionnements de nombreux organes. On trouve parmi ces toxines les entérotoxines (Staphylococcal Enterotoxin, SE) et la toxine du syndrome de choc toxique 1 (TSST-1).



**Figure 31 : Récepteurs cellulaires et ligand de *S. aureus* impliqués dans l’internalisation.**

A) Principaux effecteurs de l’internalisation de *S. aureus*, à savoir FnBP-A et FnBP-B se lient à la fibronectine, qui sert de lien intermédiaire entre la bactérie et la cellule cible, via sa fixation à l’intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . B) Effecteurs secondaires de l’internalisation de *S. aureus* et récepteurs correspondants (Josse *et al.*, 2017).

En plus de ces toxines, on retrouve un grand nombre de protéines de surface permettant à *S. aureus* d'adhérer aux cellules hôtes. C'est le cas notamment des MSCRAMM (pour Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Berry *et al.*, 2022). D'autres facteurs de virulence participent à l'échappement au système immunitaire, comme par exemple la protéine A qui séquestre les anticorps de l'hôte (Fox *et al.*, 2021).

### III.I.2 Internalisation de *S. aureus* dans les cellules non-phagocytaires de l'hôte

#### La voie FnBP

Une fois fixée sur une cellule hôte, *S. aureus* est capable de s'internaliser en son sein. Cette capacité a été mise en évidence pour un large spectre de cellules comme les ostéoblastes (Ahmed *et al.*, 2001), les fibroblastes (Usui *et al.*, 1992), les kératinocytes (Mempel *et al.*, 2002), les cellules endothéliales (Peacock *et al.*, 1999) et les cellules épithéliales (Dziewanowska *et al.*, 1999). Les protéines majoritairement impliquées dans ce mécanisme sont les protéines de liaison à la fibronectine (FnBP), notamment FnBP-A et FnBP-B (ces protéines appartiennent aux MSCRAMM décrites précédemment). Ces FnBP permettent à la bactérie de se lier à la fibronectine, un composé de la matrice extra-cellulaire. La fibronectine va elle-même se fixer sur les récepteurs  $\alpha 5\beta 1$  de la cellule (Speziale et Pietrocola 2020) (**Figure 31 A**). Il s'ensuit une internalisation se rapprochant du type « Zipper », impliquant une cascade de signalisation qui à ce jour n'est pas encore totalement comprise. L'établissement de la liaison entre les FnBP, la fibronectine et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  induit le recrutement d'un groupe de protéines comprenant les protéines FAK (Focal Adhesion Kinase), Src, PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) et Akt. Ce recrutement va conduire à un remodelage du cytosquelette d'actine de la cellule hôte et à l'internalisation de *S. aureus*.

#### Les voies alternatives

Quatre autres facteurs, appartenant également aux MSCRAMMs, sont impliqués dans l'adhésion de *S. aureus* sur les cellules hôtes (**Figure 31 B**) : SdrD (Serine aspartate repeat containing protein D), ClfA (Clumping factor A), SraP (Serine-rich adhesin for Platelets) et Atl (Autolysine).



SdrD se lie aux Desmogléines 1 des keratinocytes (Askarian *et al.*, 2016).

ClfA peut, comme les FnBP, se lier au fibrinogène, qui agit alors comme un intermédiaire entre ClfA et les récepteurs de type intégrines  $\alpha 5\beta 1$  ou  $\alpha 5\beta 3$  (McDonnell *et al.*, 2016). ClfA peut également se lier à la protéine vWbp (protéine de liaison au facteur de von Willebrand), elle-même liée au facteur de von Willebrand qui est exprimée à la surface d'endothéliums endommagés (Claes *et al.*, 2017). Dans des cellules épithéliales de glande mammaires bovines (MAC-T cells), il a été montré que ClfA se liait directement à l'Annexine 2 et que cette liaison était suffisante pour entraîner l'internalisation de la bactérie (Ashraf *et al.*, 2017).

SraP se fixe, elle, sur des récepteurs sialylés et permet l'internalisation de *S. aureus* dans des cellules épithéliales alvéolaire (A549) (Yang *et al.*, 2014).

Hirschhausen *et al.*, (2010) ont mis en évidence l'implication potentielle d'une autolysine nommée Atl dans l'internalisation de *S. aureus*. Atl est une protéine qui participe au renouvellement du peptidoglycane, mais qui a également un rôle d'adhésine, via sa liaison à la protéine HSP70 dans des cellules endothéliales de type EA.hy 926.

Enfin, la protéine Lpl (Lipoprotein-like protein) de *S. aureus* est récemment venu compléter la liste des facteurs permettant l'internalisation de *S. aureus*, via sa liaison au récepteur HSP 90 exprimé par les keratinocytes (HaCat) (Tribelli *et al.*, 2020).

En plus des MSCRAMM décrits ci-dessus, des études ont montré que l'internalisation de *S. aureus* pouvait être liée à des facteurs sécrétés. La protéine d'adhérence extracellulaire (Eap) a été montrée comme jouant un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales et aux fibroblastes, mais également dans le processus d'internalisation au sein de kératinocyte (Bur *et al.*, 2013). De façon intéressante, l'internalisation médiée par Eap n'est pas limitée à la bactérie productrice mais peut bénéficier à d'autres espèces présentes.

### III.I.3 Internalisation des CoNS dans les cellules non-phagocytaires de l'hôte

Récemment, un nombre croissant de CoNS ont été identifiés comme ayant la capacité de s'internaliser dans des types cellulaires variés. *S. epidermidis*, par exemple, est une bactérie ubiquitaire du microbiote cutané chez l'Homme et est impliquée dans un grand nombre d'infections nosocomiales. Il a été montré que *S. epidermidis* était capable de s'internaliser dans



des ostéoblastes (Khalil *et al.*, 2007), des fibroblastes (Perez et Patel, 2017), des cellules urinaire (Szabados *et al.*, 2008) et des cellules endothéliales (Hirschaussen *et al.*, 2010) mais pas dans kératinocytes, contrairement à *S. aureus* (Al Kindi *et al.*, 2019).

De manière générale, l'internalisation des CoNS est beaucoup moins efficace que celle de *S. aureus*. Cela peut s'expliquer par le fait que la principale voie utilisée par *S. aureus* pour s'internaliser dans les cellules phagocytaires non professionnelles (via les FnBP) ne semble pas être utilisée par les CoNS. En effet, aucune protéine de type FnBP n'a été identifiée à ce jour chez les CoNS (Josse *et al.*, 2017). En revanche, on retrouve des homologues de la protéine Atl chez certaines espèces CoNS. Cette protéine est notamment présente chez *S. epidermidis* (et nommée AtlE) et permet l'internalisation de cette bactérie dans les cellules endothéliales de type EA.hy 926 (Hirschaussen *et al.*, 2010).

### III.II Les *Lactobacillus*

Le genre *lactobacillus* a été originellement défini en 1901 (Beijerinck *et al.*, 1901). Plusieurs espèces de ce genre ont connu un intérêt considérable dans l'industrie agro-alimentaire et comme possible probiotique, notamment *L. reuteri* (Ragan *et al.*, 2022) et *L. plantarum*, (Ait Seddik *et al.*, 2017). La classification de ce genre, qui incluait plus de 200 espèces différentes, a récemment été révisée.

La nouvelle classification regroupe les anciennes familles des *Lactobacillaceae* et des *Leuconostocaceae* en une seule famille, les *Lactobacillaceae*, qui comprend dorénavant 26 genres (**Figure 32**). Les *Lactobacillaceae* sont des bactéries de type Gram positif, non sporulées, anaérobies facultatives ou strictes. Leur forme est ronde ou en bâtonnet. Elles peuvent former des chaînes, des paires ou des tétrades. Le principal produit de fermentation de ces bactéries est le lactate qui peut, dans certains cas, être accompagné de la production d'acétate, d'éthanol, de CO<sub>2</sub>, de formate ou de succinate.

Les *Lactobacillaceae* font partie des premières bactéries colonisant le tractus gastro-intestinal après la naissance. Leur abondance et le moment de cette colonisation étant fortement affecté par le mode de parturition et l'allaitement ou non lors des premiers mois (Rutayisire *et al.*, 2016). Leur répartition varie au long du tractus digestif. Chez la souris, elles constituent la première famille de bactérie au niveau iléal (Yang *et al.*, 2019).





L'autre niche importante des *Lactobacillaceae* est le microbiote vaginal où leur présence est indispensable pour l'homéostasie de la muqueuse vaginale (Chee *et al.*, 2020).

Ces bactéries sont essentiellement observées dans la lumière intestinale. De façon intéressante, plusieurs études ont mis en évidence des *Lactobacillus* s'étant transloqué à travers la barrière intestinale (Perdigon *et al.*, 2000). L'essentiel de ces événements de translocation semble passer par les cellules M, même si certaines espèces comme *L. acidophilus* semble pouvoir directement interagir avec les cellules épithéliales (Perdigon *et al.*, 2000). Certains *Lactobacillus*, comme *L. johnsonii*, une bactérie commensale du microbiote murin, semble d'autre part capable de survivre dans les cellules dendritiques (Udayan *et al.*, 2022).



# Objectifs

Il existe un dialogue permanent entre les bactéries du microbiote et les cellules intestinales, impliquant soit des molécules sécrétées dans la lumière intestinale soit des contacts physiques plus ou moins étroits entre ces deux partenaires. Un certain nombre de bactéries pathogènes sont en particulier capables de pénétrer à l'intérieur des cellules épithéliales intestinales. Leur internalisation leur procure une protection vis-à-vis du système immunitaire circulant, un accès aux métabolites de la cellule et leur permet éventuellement de franchir la barrière intestinale.

Notre hypothèse est que cette capacité d'internalisation, observée chez certaines bactéries pathogènes, pourrait être partagée par un ensemble plus large de bactéries, en particulier par des bactéries non pathogènes du microbiote intestinal.

Les objectifs de ce doctorat sont :

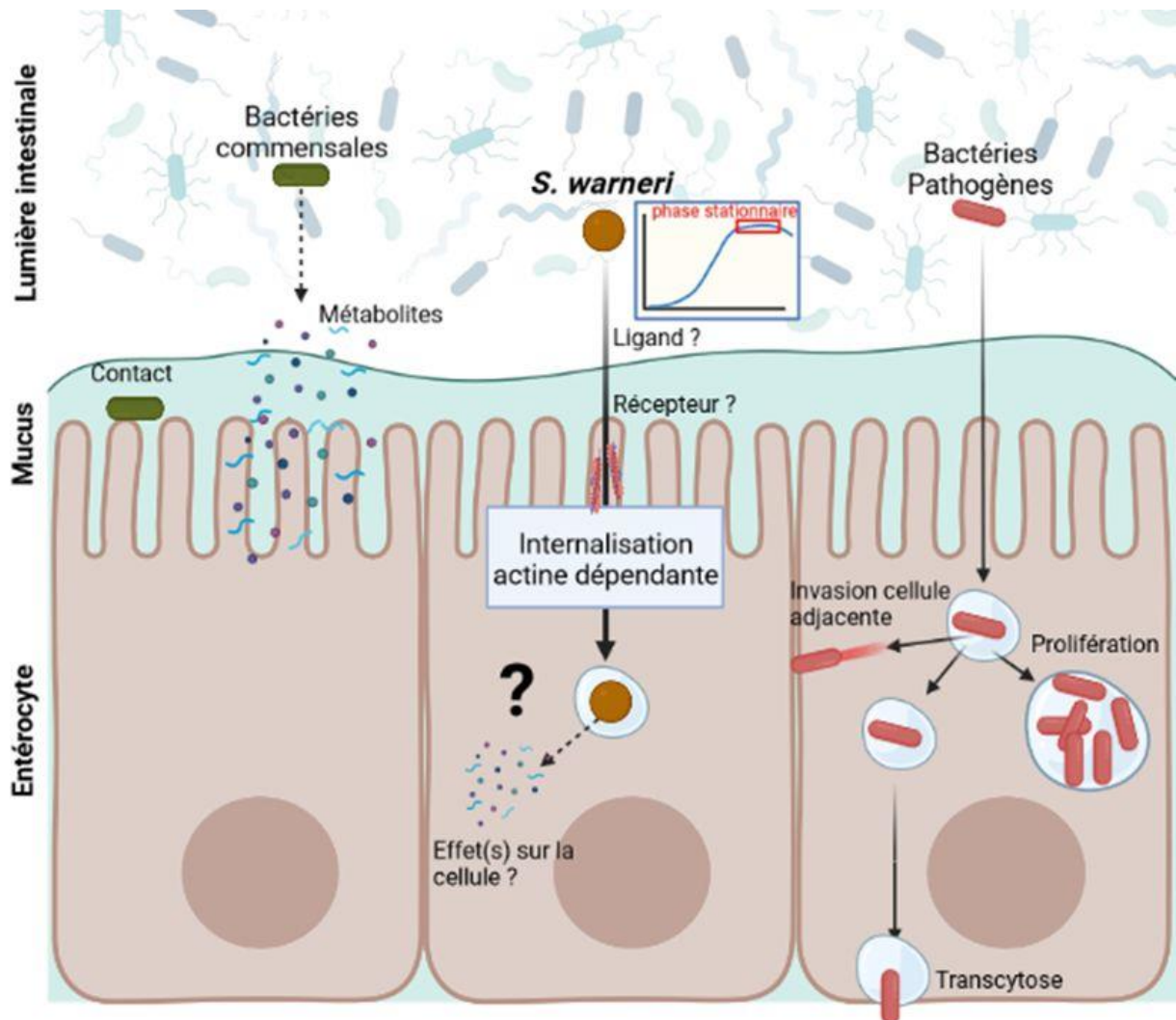
- (1) De réaliser un criblage des bactéries du microbiote intestinal pour identifier des espèces potentiellement capables de s'internaliser dans un modèle de cellules épithéliales *in vitro*.
- (2) De confirmer la capacité des bactéries identifiées à s'internaliser dans différents types cellulaires *in vitro* et dans des modèles d'épithélium intestinal *ex vivo*.
- (3) D'identifier les mécanismes impliqués dans l'internalisation de ces bactéries.
- (4) D'étudier l'effet de ces événements d'internalisation sur la physiologie intestinale.



# Résultats

## Article I

### Invasion of intestinal cells by *Staphylococcus warneri*, a resident of the human gut microbiota



*S. warneri* est une bactérie résidente du microbiote intestinal humain et murin capable de s'internaliser dans les entérocytes. Cette capacité nécessite un remodelage du cytosquelette d'actine de la cellule hôte et n'est observée que pour des bactéries cultivées en phase stationnaire. Une fois internalisée, la bactérie réside à l'intérieur de vacuoles intracytoplasmiques. Contrairement aux bactéries pathogènes, l'internalisation de *S. warneri* n'est pas suivie d'une prolifération intracellulaire de la bactérie. Les récepteurs impliqués et les effets de ces événements d'internalisation sur la physiologie de l'intestin restent à déterminer. (Créé sur BioRender.com)

# **Invasion of intestinal cells by *Staphylococcus warneri*,**

## **a resident of the human gut microbiota**

Robin Louail<sup>1,2</sup>, Franklin Florin<sup>1,2</sup>, Sophie Bernard<sup>3</sup>, Jean-Baptiste Michaud<sup>1,2</sup>, Jonathan

Breton<sup>1,2,4</sup>, Najate Achamrah<sup>1,2,4</sup>, Marie-Pierre Tivolacci<sup>1,5</sup>, Moïse Coëffier<sup>1,2,4</sup>,

David Ribet<sup>1,2,\*</sup>

1. Univ Rouen Normandie, INSERM UMR 1073, Nutrition, Inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau, F-76000 Rouen, France.

2. Univ Rouen Normandie, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), F-76000 Rouen, France.

3. Univ Rouen Normandie, PRIMACEN (Plateforme de Recherche en IMAgeRIe CELLulaire de Normandie), F-76000 Rouen, France.

4. CHU Rouen, Nutrition Department, F-76000 Rouen, France.

5. CHU Rouen, CIC-CRB 1404, F-76000 Rouen, France.

\* Corresponding author: david.ribet@inserm.fr

INSERM UMR1073 – Université de Rouen

UFR Santé - 22 Boulevard Gambetta

76183 ROUEN CEDEX

Tel: 33 (0) 2 35 14 82 40

## Abstract

Coagulase negative staphylococci (CoNS) are a heterogeneous group of bacteria colonizing different types of epithelia in humans. These bacteria have a highly variable pathogenic potential ranging from avirulent species to major nosocomial pathogens. *Staphylococcus warneri* is a CoNS species considered as non pathogenic. Here, we identified that *S. warneri* is a natural resident of both human and mice gut microbiota. In addition, we demonstrate that this bacterium is able to get internalized into human cells. We show that *S. warneri* invade efficiently several human cell types and, more specifically, intestinal epithelial cells, using actin-dependent mechanisms. In contrast to *bona fide* pathogens, *S. warneri* does not actively replicate within intestinal cells and does not resist killing by macrophages. Together, our results highlight that bacteria from the human gut microbiota, which are not associated with a high pathogenic potential, can actively invade intestinal cells and may, in this way, impact intestinal physiology.

**Keywords:** host-bacteria interactions, gut microbiota, coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus warneri*, intestinal epithelium, pathogenic potential, internalization, intracellular bacteria.



## Background

Human intestinal cells are living in close contact with trillions of bacteria (1). Most of these bacteria are thriving in the intestinal lumen in physiological conditions and do not engage direct physical contacts with host cells. In contrast to commensal or symbiotic bacteria, “professional” pathogens may adhere to intestinal cells and eventually get internalized in these cells. Internalization into non-phagocytic cells is a strategy shared by several bacterial pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium or *Shigella flexneri*. Indeed, adopting an intracellular lifestyle provides various advantages: bacteria become inaccessible to humoral attacks, anti-microbial peptides or even antibiotics, they avoid shear stress-induced clearance and they get access to a potentially wide range of intracytoplasmic nutrients (2). They may finally cross the cell membrane again to egress and infect neighboring cells or get access to deeper tissues (2, 3).

Bacteria-host interactions in the intestine is however more complex than this dichotomy between “good” and “bad” bacteria. Indeed, some gut bacterial species may either act as commensals/symbionts in regular conditions or promote disease when conditions are altered in the intestinal environment. The “pathogenic potential” of bacteria from the gut microbiota is thus highly variable and context-dependent (4, 5).

Coagulase negative staphylococci (CoNS) are a heterogenous group of bacteria colonizing different types of epithelia in humans and detected in both the skin and the gut microbiota (6, 7). These bacteria have a highly variable pathogenic potential. *S. epidermidis*, for example, is a major nosocomial pathogen able to invade human cells (6, 8-11). *S. warneri*, in contrast, is a CoNS species that has only rarely been associated with infections and its ability to invade epithelial cells has not yet been characterized (6). *S. warneri* is a well-established member of

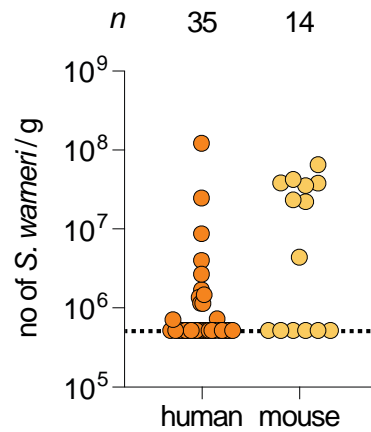
the human skin microbiota. It has also been detected in the human gut microbiota, but mainly in the case of young children and premature infants (12-17). The occurrence of *S. warneri* in the gut microbiota of adults is in contrast poorly documented.

In this study, we quantified the prevalence of *S. warneri* in the gut microbiota of human adults, evaluated the ability of this bacterium to get internalized into intestinal cells and discuss the pathogenic potential of this resident of the gut microbiota.

## Results

### ***S. warneri* is naturally present in the gut microbiota of mice and humans.**

To assess whether *S. warneri* is naturally present in the gut microbiota of humans and mice, we designed specific primers targeting the *S. warneri sodA* gene (which codes for a manganese-dependent superoxide dismutase). This gene exhibits higher sequence divergence than the 16S rRNA gene and thus constitutes a better target to discriminate CoNS species (18). We used these primers to quantify the number of *S. warneri* by performing quantitative PCR on DNA extracted from pathogen-free murine cecal contents or from fecal samples of healthy individuals. The specificity of these primers was validated by sequencing the amplified PCR products. The total amounts of Eubacteria in these samples were quantified in parallel. In humans, we detected *S. warneri* in 34% of healthy individuals with a mean abundance of  $1.3 \times 10^7$  bacteria/g of feces (corresponding to ~0.08% of total Eubacteria) (Fig. 1). No significant differences were observed between males and females (detection of *S. warneri* in 3/6 males and 9/29 females; Fisher's exact test). In mice, we detected *S. warneri* in the caecal microbiota from 57% of animals, with abundances similar to those observed in humans ( $3.2 \times 10^7$  *S. warneri*/g of cecal content, *i.e.* ~0.06% of total Eubacteria) (Fig. 1). Together, these results demonstrate that *S. warneri* is a natural resident of both mouse and human gut microbiota.



**Figure 1: *S. warneri* is a resident of the human and mouse gut microbiota.**

Quantification of *S. warneri* in human fecal samples and mouse cecal contents (detection threshold,  $5 \cdot 10^5$  bacteria/g; dashed line). The number ( $n$ ) of individuals or animals analyzed is indicated above the graph.

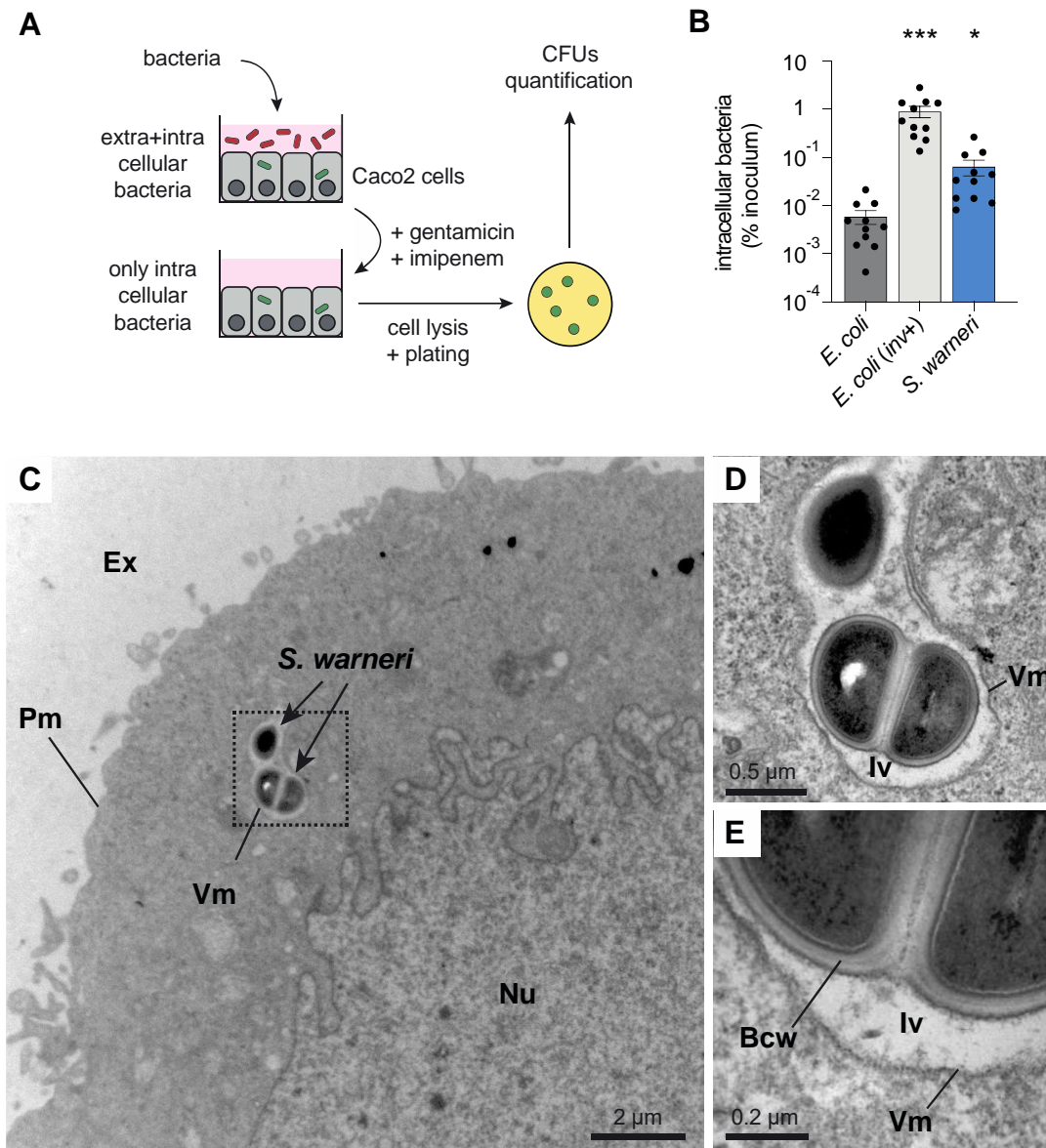
### ***S. warneri* can invade human Caco2 cells.**

In order to evaluate the ability of *S. warneri* to invade intestinal cells, we performed gentamicin/imipenem-protection assays (19) (Fig. 2A). For this, *S. warneri* grown in stationary-phase in BHI broth were added on Caco2 cells with an MOI (Multiplicity of Infection) of 100. After 1 hour of incubation at 37°C, extra-cellular bacteria were eliminated by extensive washing of cells and by addition of a mix of gentamicin and imipenem in the cell culture medium (these two antibiotics do not cross efficiently eukaryotic membranes and thus do not kill intracellular bacteria). Caco2 cells were then lysed and cell lysates (containing potential intracellular bacteria) were spread on BHI agar plates. CFUs (Colony-Forming Units) obtained after one day of incubation at 37°C were finally quantified to estimate the number of bacteria that were internalized into Caco2 cells (Fig. 2A). Three different bacteria were compared here: *S. warneri* (a strain isolated from the cecum of a C57Bl/6 mouse), *E. coli* (K12), which is considered as a non-invasive species, and *E. coli* transformed with an expression vector coding for the *Y.*

*pseudotuberculosis* invasin gene, which confers the ability to efficiently invade non-phagocytic cells (*E. coli*/inv<sup>+</sup>) (20). Quantification of the CFUs obtained after the gentamicin/imipenem protection assays shows that *S. warneri* is able to invade Caco2 cells, with an internalization efficiency significantly higher than the one of *E. coli* (~11 times higher) (Fig. 2B).

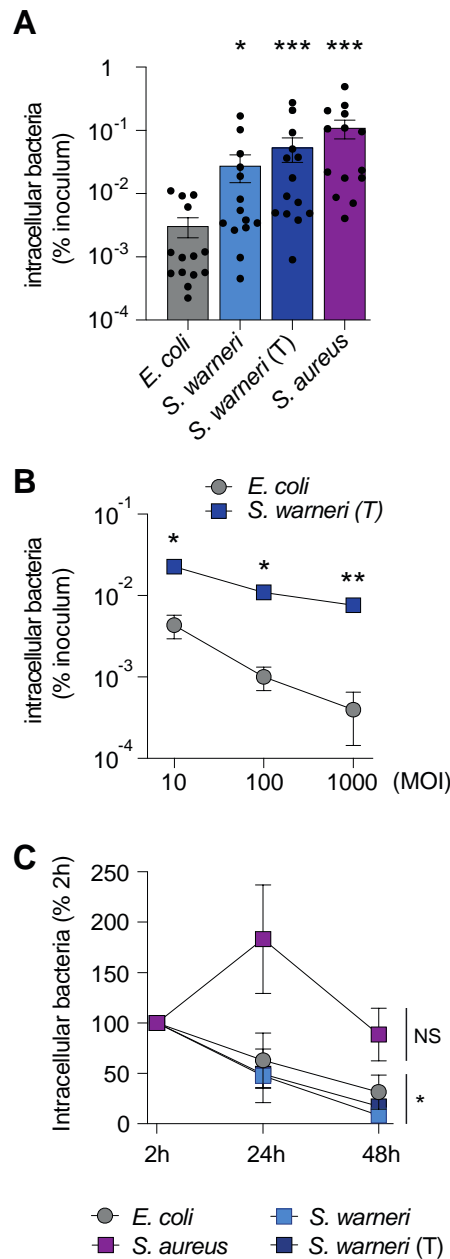
To confirm these results, we performed electron microscopy observations of Caco2 cells co-incubated for 2 hours with *S. warneri*. We observed several examples of *S. warneri* internalized in Caco2 cells (Fig. 2C-E). All detected bacteria were localized in internalization vacuoles. We could not detect any bacteria free in the cytosol. These results confirm the ability of *S. warneri* to get internalized into intestinal cells and suggest that this bacterium does not quickly escape from its internalization vacuole, as observed for pathogenic bacteria such as *L. monocytogenes* or *S. flexneri* (21).

To complete our results, which were obtained with an intestinal strain of *S. warneri*, we evaluated the internalization efficiency of the *S. warneri* type strain AW25<sup>T</sup> (isolated from human skin; (22)). We also quantified in parallel the internalization efficiency of the bacterial pathogen *Staphylococcus aureus* (RN4220 strain) (23). As previously observed with the intestinal *S. warneri* strain, the *S. warneri* AW25<sup>T</sup> type strain is able to invade Caco2 cells, with an internalization efficiency significantly higher than the one of *E. coli* (~17 times higher) (Fig. 3A). As expected, *S. aureus* (RN4220 strain) also efficiently invades Caco2 cells, with an internalization efficiency ~36 times higher than the one of *E. coli* (Fig. 3A). These results highlight that the invasive properties of *S. warneri* are shared between strains isolated from different niches.



**Figure 2: *S. warneri* can get internalized into Caco2 cells.**

A, Description of the gentamicin/imipenem-protection assays used to quantify internalization efficiencies in Caco2 cells. B, Quantification of intracellular bacteria, expressed as the percentage of bacteria initially co-incubated with Caco2 cells (% of inoculum) (mean  $\pm$  s.e.m.;  $n=11$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs *E. coli*; Friedman test with Dunn's correction). C-E, Electron microscopy observations of *S. warneri* internalized in Caco2 cells (Bcw, bacteria cell wall; Ex, extracellular medium; Iv, internalization vacuole; Nu, nucleus; Pm, plasma membrane; Vm, vacuolar membrane).



**Figure 3: Internalization efficiencies and survival of *S. warneri* in non-phagocytic cells.**

A, Quantification of intracellular bacteria in Caco2 cells (% of inoculum) (mean  $\pm$  s.e.m.;  $n=14$ ; \*,  $P<0.05$ ; \*\*\*,  $P<0.001$  vs *E. coli*; Friedman test with Dunn's correction). B, Quantification of intracellular bacteria (% of inoculum) (mean  $\pm$  s.e.m.;  $n=3-4$ ; \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$  vs *E. coli*; 2-way ANOVA with Sidak's correction). C, Quantification of intracellular bacteria,

expressed as the percentage of intracellular bacteria recovered at 2h (mean  $\pm$  s.e.m.;  $n=6$ ; NS, not significant; \*,  $P<0.05$  vs 2h; 2-way ANOVA with Sidak's correction).

We further evaluated the internalization capacity of the *S. warneri* AW25<sup>T</sup> type strain in Caco2 cells at different MOI (10, 100 or 1000). We observed that, for each MOI, the internalization efficiency of *S. warneri* is significantly higher than the one of *E. coli* (Fig. 3B).

### **Survival of intracellular *S. warneri* in phagocytic and non-phagocytic cell lines.**

Once internalized, bacteria may either be killed by host cells or survive and eventually proliferate. We evaluated the survival of *S. warneri* in intestinal cells by monitoring the number of intracellular bacteria one or two days after internalization in Caco2 cells. We observed that the number of intracellular *S. warneri* gradually decreases in Caco2 cells, with about 50% of bacteria recovered at 24h and less than 20% at 48h (Fig. 3C). In contrast, we showed that the number of intracellular *S. aureus* does not decrease 48h after internalization (Fig. 3C). These results suggest that *S. warneri* does not actively replicate inside intestinal cells after internalization.

Invading pathogens that cross the intestinal barrier can be phagocytosed and killed by macrophages, unless the phagocytosed bacteria express virulence factors allowing their survival in these immune cells. To determine whether *S. warneri* could resist killing by macrophages, we incubated this bacterium with RAW264.7 cells (a murine macrophage cell-line). We observed a strong decrease in the number of intracellular *S. warneri* with only  $5.1 \pm 4.0$  % of bacteria left at 24h compared to 2h. These results indicate that *S. warneri* is not able to resist killing by macrophages.

### ***S. warneri* can invade both intestinal and non-intestinal human cells.**

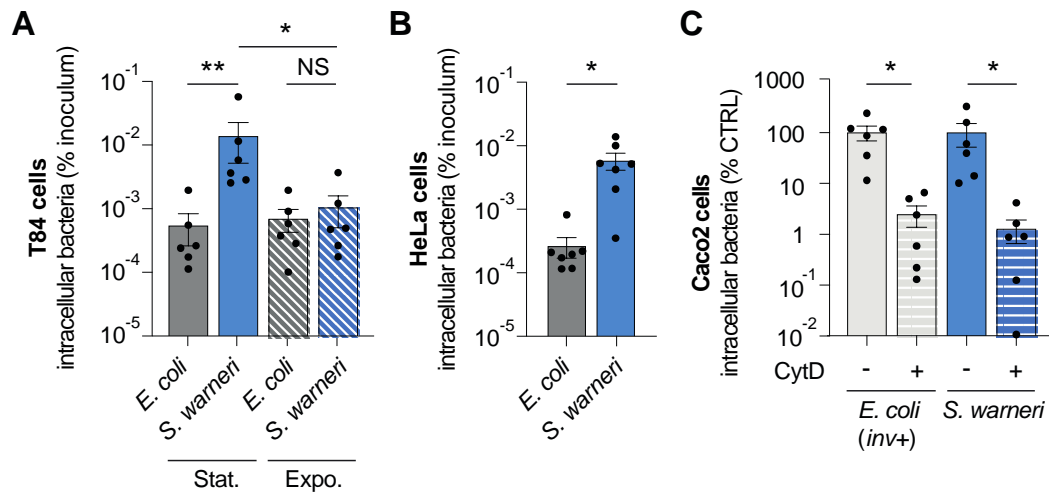
We quantified the internalization of *S. warneri* in two additional human epithelial cell lines: T84 cells, another intestinal cell line, and HeLa cells, a non-intestinal cell line. As for Caco2 cells, we observed a significant internalization of *S. warneri* in these cells in comparison to *E. coli* (~25x and ~22x higher than *E. coli* in T84 and HeLa cells, respectively; Fig. 4A and 4B). Together, these results demonstrate that *S. warneri* is able to invade several non-phagocytic human cell lines *in vitro*.

We then compared the internalization efficiency of *S. warneri* grown either in stationary phase or in exponential phase. Interestingly, we observed a significantly higher internalization of *S. warneri* for bacteria grown in stationary phase (Fig. 4A), suggesting that the bacterial factors mediating *S. warneri* internalization are expressed specifically during this growth phase.

### ***S. warneri* internalization is actin-dependent.**

The majority of intestinal professional pathogens use actin-based mechanisms to mediate their internalization into non-phagocytic cells (24). In order to determine whether *S. warneri* internalization requires host cell actin remodeling, we pre-treated Caco2 cells with Cytochalasin D, a mycotoxin inhibiting actin polymerization. As expected, we observed that the internalization of *E. coli/inv<sup>+</sup>* is inhibited by Cytochalasin D, since *Y. pseudotuberculosis* invasin-mediated entry is actin-dependent (25) (Fig. 4C). In the case of *S. warneri*, we also observed a strong decrease in the internalization efficiency in cells treated with Cytochalasin D, demonstrating that this CoNS species uses actin-dependent internalization mechanisms to invade host cells (Fig. 4C).





**Figure 4: *S. warneri* invades both intestinal and non-intestinal cells using actin-dependent mechanisms.**

A, Quantification of intracellular bacteria in T84 cells after growth in stationary (stat.) or exponential (expo.) phases (% of inoculum) (mean  $\pm$  s.e.m.;  $n=6$ ; \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; Two-tailed Mann-Whitney test). B, Quantification of intracellular bacteria in HeLa cells (% of inoculum) (mean  $\pm$  s.e.m.;  $n=7$ ; \*,  $P<0.05$ ; Two-tailed Wilcoxon test). C, Quantification of bacterial internalisation in Caco2 cells pre-treated or not with Cytochalasin D (CytD), expressed as the percentage of control conditions (no CytD) (mean  $\pm$  s.e.m.;  $n=6$ ; \*,  $P<0.05$ ; Two-tailed Wilcoxon test).

## Discussion

In this study, we highlight that *S. warneri* is a natural resident of the human adult gut microbiota with a prevalence of ~34% in a population of healthy individuals. Interestingly, we also detected *S. warneri* in the mice gut microbiota, thereby confirming previous observations of this bacterium in fecal samples from other Mammals (26-30). Together, these results suggest that *S. warneri* is a common resident of the gut microbiota from Mammals.

We further demonstrate that *S. warneri* can get internalized into human cells. Using antibiotics-protection assays, we show that it can invade efficiently several human cell types and, more specifically, intestinal epithelial cells using actin-dependent mechanisms. One limitation of our *in vitro* invasion assays is the absence of a mucus layer, which, *in vivo*, keeps intestinal bacteria distant from the epithelium. Even though this mucus layer may preclude *S. warneri* from reaching intestinal cells *in vivo* in normal situations, specific conditions such as inflammation, local decrease in mucus thickness or dysbiosis and proliferation of mucus-degrading intestinal bacteria may facilitate *S. warneri* access to intestinal epithelial cells, leading eventually to their internalization.

The ability of Staphylococci species to invade human cells has been mostly studied in the case of *S. aureus*, which can invade various cell lines such as endothelial cells, epithelial cells, keratinocytes and osteoblasts (31). This mechanism allows *S. aureus* to escape host humoral immune responses, avoid shear stress-induced clearance and evade antibiotic activities. *S. aureus* survival in non-phagocytic cells thus facilitates bacterial persistence and promotes chronic infections. Internalization of *Staphylococcus non-aureus* species in human cells has also been reported for *S. lugdunensis* (11, 32, 33), *S. saprophyticus* (34, 35), *S. pseudintermedius* (36), *S. delphini* (37) and *S. epidermidis* (8-11), which are classically

considered as opportunistic pathogens (6). Pathogenic CoNS species are responsible for foreign body-related infections as well as infections in preterm newborns (6). Colonization of the skin and mucosa by these bacteria may constitute an important source of endogenous infections. These bacteria can indeed switch between the non-pathological colonization of body surfaces to infections and uncontrolled replication thanks to decreases in host immune surveillance (for example in immunocompromised individuals) or breaches in the skin or mucosa barriers (for example during insertion of catheters or implantation of orthopedic devices). Some clinical cases of bloodstream infections by *S. epidermidis* in adults or in preterm neonates showed that genetically similar *S. epidermidis* strains were present in the gut of these patients, which may thus constitute the source of infection (38, 39). In contrast to *S. epidermidis*, only few cases of *S. warneri* infections have been reported, suggesting a lower pathogenic potential. Our results, which show that *S. warneri* is able to invade enterocytes, raise the question of the consequences of these internalization events on intestinal physiology. It would be in particular interesting to decipher whether these internalization events trigger local inflammation in response to the detection of the bacteria by the innate immune system, or promote the translocation of *S. warneri* across the intestinal barrier, thereby facilitating infection of deeper tissues. Another possibility would be that internalization of *S. warneri* into intestinal cells constitute a yet uncharacterized type of mutualistic interactions between human cells and gut bacteria.

## **Conclusions**

Our results highlight that some bacteria, which are natural resident of the human gut microbiota and not classified as pathogenic microbes, can invade intestinal cells. This work challenges the classic dichotomic conception of host-bacteria interactions in the gut, with

commensal/symbiotic bacteria on one hand, and *bona fide* pathogens on the other hand. It now paves the way for future studies aiming at deciphering the consequences of these internalization events on intestinal physiology, both in healthy and pathological conditions.

## **Methods**

### ***Preparation of mouse cecal contents***

Eight-weeks-old C57Bl/6JRj male mice (Janvier Labs, Le-Genest-Saint-Isle, France) were housed at 23°C (5 animals/cage) with a 12-h light-dark cycle in regular open cages. All animals were fed with a non-sterilized standard rodent diet (3430.PM.S10, Serlab, France). Drinking water was not sterilized. After 1 week of acclimatization to the animal facility, animals were euthanized by an intraperitoneal injection of an overdose of ketamine (200 mg/kg BW) and xylazine (20 mg/kg BW). Caeca were then removed and opened longitudinally to recover cecal contents.

### ***Cell culture***

Human intestinal Caco2 cells (ATCC HTB-37) and human non intestinal HeLa cells (ATCC CCL-2) were cultivated in Minimum Essential Medium Eagle (MEM; Eurobio) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-Glutamine, 1% non essential amino acids (Sigma-Aldrich) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco). Human intestinal T84 cells (ATCC CCL-248) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12 (1:1) (Eurobio) supplemented with 10% FCS and 2.5 mM L-Glutamine. Murine RAW264.7 macrophages (ATCC TIB-71) were cultivated in DMEM supplemented with 10% FCS and 2 mM L-

Glutamine. All cell lines were cultivated in the presence of penicillin ( $1.10^4$  U/mL) and streptomycin (10 mg/mL) (Panbiotech), except during invasion assays.

### ***Bacterial strains***

Strains used in this study were: *Staphylococcus warneri* AW25 type strain (DSM 20316, DSMZ, Germany), *Staphylococcus warneri* BOD010 strain (isolated from mouse cecal content; this study), *Staphylococcus aureus* RN4220 strain (DSM 26309, DSMZ, Germany), *Escherichia coli* K12 strain and *E. coli* transformed with the pRI203 plasmid encoding the *Yersinia pseudotuberculosis inv* locus (BUG1966; kind gift of P. Cossart, Institut Pasteur, Paris, France) (20). Staphylococcal species were grown in brain heart infusion (BHI) broth or agar plates (BD Biosciences) at 37°C. *Escherichia coli* were grown in LB broth or agar plates (BD Biosciences). All bacterial strains used in this study are sensitive to 50 µg/mL gentamicin and 50 µg/mL imipenem.

### ***Invasion assays***

Caco2, T84 and HeLa were seeded at a density of  $1.6 \times 10^5$  cells per  $\text{cm}^2$  and RAW264.7 cells at a density of  $1 \times 10^5$  cells per  $\text{cm}^2$  the day before invasion assays. Cells were cultivated in FCS- and antibiotics-free culture media, with or without 1 µg/mL Cytochalasin D (Sigma-Aldrich) for 1 h before the addition of bacteria. Bacteria grown in exponential or stationary phases were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), added to cells at a multiplicity of infection (MOI) of 10 to 1000 and centrifuged on cells for 3 min at 80xg. After 1 h of co-incubation, cells were washed twice with PBS 1x and incubated with FCS-containing fresh medium supplemented with 50 µg/ml gentamicin (Euromedex) and 50 µg/ml imipenem (Sigma-Aldrich) to kill extracellular bacteria. 2h, 24h or 48h after the beginning of the co-incubations,

cells were washed three times with PBS 1x and lysed with PBS–0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). The number of viable intracellular bacteria released from lysed cells was assessed by plating cell lysates on agar plates.

### ***Transmission electron microscopy***

8.4.10<sup>5</sup> Caco2 cells, coincubated for 1 hour with *S. warneri* and 1 hour with gentamicin and imipenem were harvested using trypsin and centrifuged for 5 min at 1,500xg. Pelleted cells were then suspended in 100 µL of 2% w/v low gelling temperature agarose (2-hydroxyethyl agarose; Sigma-Aldrich) in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), incubated 10 min on ice to solidify and cut in 1 mm blocks. Agarose blocks containing cells were then fixed for 2h in 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde mixture (v/v) in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) and washed (2x10 min) in cacodylate buffer. Samples were post-fixed during 1 h in 1% tetroxyde osmium (v/v) in cacodylate buffer and washed as previously. Then, samples were dehydrated in an ethanol series (50, 75, 95 and 2x100%) 20 min each and transferred to an embedding resin (Spurr Resin) through a Spurr–ethanol series (8h 25%, 16h 50%, 8h 75% and 2x24h 100%). The resin was finally polymerized at 50°C for 24 h. Ultrathin sections from resin blocks (90 nm; EM UC6 Leica microsystems) were collected on coated formvar/carbon nickel grids and stained with uranyl acetate (0.5% w/v in methanol, 10 min) and Reynolds lead citrate (20 min). Observations of at least 190 cells from two independent resin blocks were made with a FEI Tecnai 12 Biotwin transmission electron microscope operating at 80 kV, with ES500 W Erlangshen CCD camera (Gatan).

### ***Quantification of S. warneri in human fecal samples by quantitative PCR***

DNA was extracted from the cecal contents of three independent groups of 8-weeks-old C57Bl/6JRj male mice (Janvier Labs, Le-Genest-Saint-Isle, France) or from human fecal samples from a biocollection of healthy individuals. Samples from 7 men (26-51 years old (mean 35.3); Body Mass Index (BMI): 21.6-24.8 kg.m<sup>-2</sup> (mean 23.7)) and 29 women (23-59 years old (mean 32.6); BMI: 19.1-24.5 kg.m<sup>-2</sup> (mean 21.4)) were included for analysis. DNA was extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), including a bead-beating step (0.1 mm zirconia silica beads, BioSpec products, Bartlesville, USA) (40). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed on these DNA samples using Mastercycler *ep* Realplex system (Eppendorf, Hamburg, Germany) and Itaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad). Primers used for the detection of *S. warneri* were Sw\_sodA\_F (5'-TCTGATATTCAAAGTGCAGTAAGA-3') and Sw\_sodA\_R (5'-AACAACTAACCAAGCCCAAC-3'). The specificity of *S. warneri* sodA primer pair was evaluated by cloning qPCR amplification products from at least three independent DNA samples, using the Zero Blunt PCR cloning kit (Invitrogen), and by verifying that more than 80% of PCR products have a sequence corresponding to *S. warneri* sodA gene. Primers used for the detection of Eubacteria were Eub-338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') and Eub-518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (41). All samples were run in duplicate in 96-well reaction plates. Final concentrations were as follow: DNA, 4 ng/μL; primers 0.5 μM; SYBR Green Supermix 1X. Thermocycling conditions were as follow: initiation step 5 min at 95°C; cycling stage: 5 s at 95°C, 30 s at 63°C or 60°C (for *S. warneri* and Eubacteria primers, respectively), 15 s at 95°C, 40 cycles; melt curve stage 15 s at 95°C, 15 s at 65°C, increment of 1°C every 10 s until reaching 95°C. Quantification were performed by comparing the Cq of each sample with a standard curve made by diluting genomic DNA extracted from pure cultures of *S. warneri* and *E. coli*, for which cell counts were determined prior to DNA isolation. Non-template controls were included on each plate.

### ***Statistical analysis***

Comparison of *S. warneri* prevalence between males and females was performed using Fisher's exact test. Comparison of internalization efficiencies between different bacterial species or different cell culture conditions were performed using Friedman's test with Dunn's correction or with two-tailed Wilcoxon's test. Comparison of internalization efficiencies between different bacterial growth phases were performed using two-tailed Mann-Whitney's test. Kinetics of intracellular bacteria survival and MOI-dependent internalization were analyzed by 2-way ANOVA with Sidak's correction. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA).



## **Declarations**

### ***Ethics approval and consent to participate***

Human fecal samples used in this study come from the biocollection associated with the Eating Disorders Inventory Longitudinal Study (EDILS) cohort (Rouen University Hospital; authorization DC 2014-2189). Animal care and experimentation were approved by a regional Animal Experimentation Ethics Committee (APAFIS#21102–2019061810387832) and complied with the guidelines of the European Commission for the handling of laboratory animals (Directive 2010/63/EU). All efforts were made to minimize suffering of animals.

### ***Consent for publication***

Not applicable.

### ***Availability of data and materials***

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

### ***Competing interests***

The authors declare that they have no competing interests.

### ***Funding***

This work was supported by INSERM, Rouen University, the iXcore Foundation for Research and the Regional Council of Normandie (RIN Recherche 2019 Emergent). Europe gets involved

in Normandie with the European Regional Development Fund (ERDF). Funding bodies played no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

### ***Authors' contributions***

Conceptualization, DR; Funding acquisition, MC and DR; Investigation, RL, FF, SB, JBM and JB; Resources, NA and MPT; Supervision, MC and DR; Visualization, SB and DR; Writing – original draft, DR. All authors read and approved the final manuscript.

### ***Acknowledgements***

We thank Arnaud Echard for proofreading the manuscript, Pascale Cossart for proofreading the manuscript and providing the *E. coli/inv+* strain. We thank the staff of the CIC-CRB 1404 (CHU Rouen) for their assistance with human samples management and processing.

### **References**

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533.
2. Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 2015;17(3):173-83.
3. Doran KS, Banerjee A, Disson O, Lecuit M. Concepts and mechanisms: crossing host barriers. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(7).
4. Casadevall A. The Pathogenic Potential of a Microbe. *mSphere.* 2017;2(1).

5. Jochum L, Stecher B. Label or Concept - What Is a Pathobiont? *Trends Microbiol.* 2020;28(10):789-92.
6. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):870-926.
7. Luqman A, Nega M, Nguyen MT, Ebner P, Gotz F. SadA-Expressing Staphylococci in the Human Gut Show Increased Cell Adherence and Internalization. *Cell Rep.* 2018;22(2):535-45.
8. Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, Nair SP. Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect.* 2007;9(4):460-5.
9. Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Gotz F, Peters G, Heilmann C. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol.* 2010;12(12):1746-64.
10. Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Lustig S, Chanard E, Meugnier H, *et al.* *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS One.* 2013;8(6):e67240.
11. Campoccia D, Montanaro L, Ravaioli S, Cangini I, Testoni F, Visai L, *et al.* New Parameters to Quantitatively Express the Invasiveness of Bacterial Strains from Implant-Related Orthopaedic Infections into Osteoblast Cells. *Materials (Basel).* 2018;11(4).
12. Savey A, Fleurette J, Salle BL. An analysis of the microbial flora of premature neonates. *J Hosp Infect.* 1992;21(4):275-89.
13. Dominguez E, Zarazaga M, Torres C. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from fecal samples of healthy children. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2638-41.
14. Sanchez E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal *Staphylococcus* spp. and virulent features associated with coeliac disease. *J Clin Pathol.* 2012;65(9):830-4.
15. Hira V, Kornelisse RF, Sluijter M, Kamerbeek A, Goessens WH, de Groot R, *et al.* Colonization dynamics of antibiotic-resistant coagulase-negative Staphylococci in neonates. *J Clin Microbiol.* 2013;51(2):595-7.

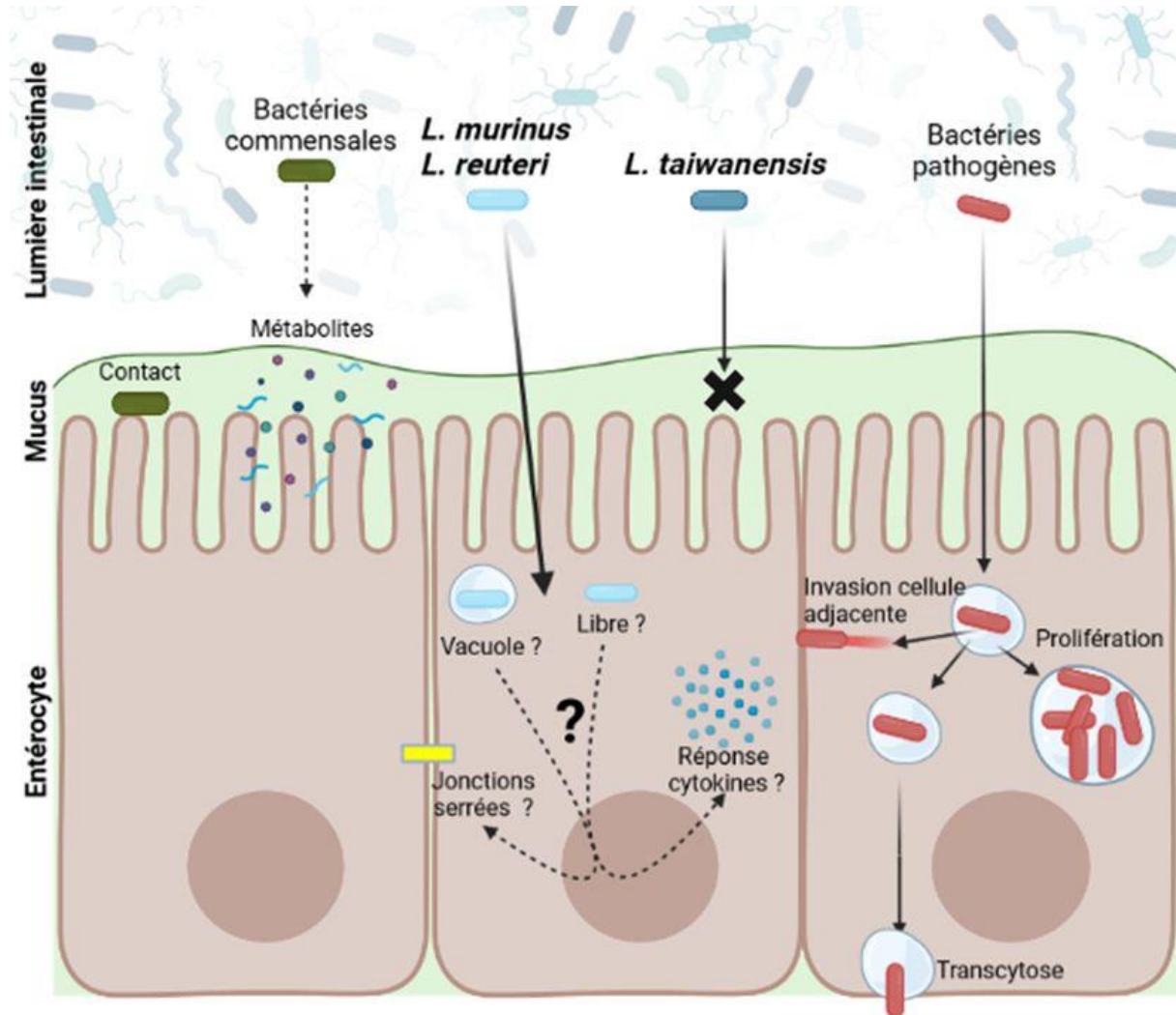
16. Aujoulat F, Roudiere L, Picaud JC, Jacquot A, Filleron A, Neveu D, *et al.* Temporal dynamics of the very premature infant gut dominant microbiota. *BMC Microbiol.* 2014;14:325.
17. Golinska E, Strus M, Tomusiak-Plebanek A, Wiecek G, Koziem L, Lauterbach R, *et al.* Coagulase-Negative Staphylococci Contained in Gut Microbiota as a Primary Source of Sepsis in Low- and Very Low Birth Weight Neonates. *J Clin Med.* 2020;9(8).
18. Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4296-301.
19. Elsinghorst EA. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol.* 1994;236:405-20.
20. Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell.* 1987;50(5):769-78.
21. Bianchi F, van den Bogaart G. Vacuolar escape of foodborne bacterial pathogens. *J Cell Sci.* 2020;134(5).
22. Kloos WE, Schleifer KH. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int J Syst Bacteriol.* 1975;25:62-79.
23. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(1):49-62.
24. Carabeo R. Bacterial subversion of host actin dynamics at the plasma membrane. *Cell Microbiol.* 2011;13(10):1460-9.
25. Wiedemann A, Linder S, Grassl G, Albert M, Autenrieth I, Aepfelbacher M. *Yersinia enterocolitica* invasins triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol.* 2001;3(10):693-702.
26. Lawley TD, Clare S, Walker AW, Stares MD, Connor TR, Raisen C, *et al.* Targeted restoration of the intestinal microbiota with a simple, defined bacteriotherapy resolves relapsing *Clostridium difficile* disease in mice. *PLoS Pathog.* 2012;8(10):e1002995.

27. Liu C, Zhou N, Du MX, Sun YT, Wang K, Wang YJ, *et al.* The Mouse Gut Microbial Biobank expands the coverage of cultured bacteria. *Nat Commun.* 2020;11(1):79.
28. Kmet V, Cuvalova A, Stanko M. Small mammals as sentinels of antimicrobial-resistant staphylococci. *Folia Microbiol (Praha).* 2018;63(5):665-8.
29. Bino E, Laukova A, Scerbova J, Kubasova I, Kandricakova A, Strompfova V, *et al.* Fecal coagulase-negative staphylococci from horses, their species variability, and biofilm formation. *Folia Microbiol (Praha).* 2019;64(6):719-26.
30. Laukova A, Bino E, Kubasova I, Strompfova V, Miltko R, Belzecki G, *et al.* Characterisation of Faecal Staphylococci from Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and Red Deer (*Cervus elaphus*) and Their Susceptibility to Gallidermin. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2020;12(1):302-10.
31. Josse J, Laurent F, Diot A. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Front Microbiol.* 2017;8:2433.
32. Pereira EM, Teixeira CAA, Alvarenga ALM, Schuenck RP, Giambiagi-deMarval M, Holandino C, *et al.* A Brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology may adhere to and invade lung epithelial cells. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 4):463-9.
33. Hussain M, Steinbacher T, Peters G, Heilmann C, Becker K. The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm formation and internalization. *Int J Med Microbiol.* 2015;305(1):129-39.
34. Szabados F, Kleine B, Anders A, Kaase M, Sakinc T, Schmitz I, *et al.* *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 is internalized into human urinary bladder carcinoma cell line 5637. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;285(2):163-9.
35. Szabados F, Albrecht A, Kleine B, Kaase M, Gatermann S. In contrast to human isolates animal isolates of *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* are not internalized into human urinary bladder carcinoma cell line 5637. *Vet Microbiol.* 2009;139(3-4):417-8.
36. Maali Y, Martins-Simoes P, Valour F, Bouvard D, Rasigade JP, Bes M, *et al.* Pathophysiological Mechanisms of *Staphylococcus Non-aureus* Bone and Joint Infection: Interspecies Homogeneity and Specific Behavior of *S. pseudintermedius*. *Front Microbiol.* 2016;7:1063.

37. Maali Y, Diot A, Martins-Simoes P, Bes M, Bouvard D, Vandenesch F, *et al.* Identification and Characterization of *Staphylococcus delphini* Internalization Pathway in Nonprofessional Phagocytic Cells. *Infect Immun.* 2020;88(5).
38. Soeorg H, Huik K, Parm U, Ilmoja ML, Metelskaja N, Metsvaht T, *et al.* Genetic relatedness of coagulase-negative Staphylococci from gastrointestinal tract and blood of preterm neonates with late-onset sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(4):389-93.
39. Tamburini FB, Andermann TM, Tkachenko E, Senchyna F, Banaei N, Bhatt AS. Precision identification of diverse bloodstream pathogens in the gut microbiome. *Nat Med.* 2018;24(12):1809-14.
40. Tirelle P, Breton J, Riou G, Dechelotte P, Coeffier M, Ribet D. Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):340.
41. Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):4117-20.

## Article II

### Invasion of enterocytes by intestinal *Lactobacillaceae*



Plusieurs espèces de la famille des *Lactobacillaceae* possèdent la capacité de pénétrer à l'intérieur des cellules de l'épithélium intestinal. Parmi celles-ci, *L. murinus* et *L. reuteri*, qui sont des bactéries résidentes du microbiote intestinal. La bactérie *L. taiwanensis*, proche phylogénétiquement de *L. gasseri*, est incapable de pénétrer efficacement dans les entérocytes, illustrant ainsi que cette capacité n'est observée que pour certaines espèces ou souches de *Lactobacillaceae*. Même si les mécanismes et les effets de ces internalisations sur la physiologie intestinale restent à découvrir, l'identification de bactéries intestinales non-pathogènes capables de s'internaliser apporte un nouvel angle de vue sur les interactions bactéries-cellules intestinales. (Créé sur BioRender.com)

## BRIEF REPORT

### Invasion of enterocytes by intestinal *Lactobacillaceae*

Robin Louail<sup>1,2</sup>, Amélie Cresson<sup>1,2</sup>, Léa Loison<sup>1,2</sup>, Nadine Montbrion,<sup>1,2</sup> Moïse Coëffier<sup>1,2,3</sup>,

David Ribet<sup>1,2,\*</sup>

1. Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM UMR 1073, Nutrition, Inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau, Rouen, France.

2. Normandie Univ, UNIROUEN, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France.

3. CHU Rouen, Nutrition Department, Rouen, France.

\* Corresponding author: david.ribet@inserm.fr

INSERM UMR1073 – Université de Rouen

UFR Santé - 22 Boulevard Gambetta

76183 ROUEN CEDEX

Tel: 33 (0) 2 35 14 82 40



## ABSTRACT

Our actual conception of host-bacteria interactions in the intestinal tract is usually dichotomic with commensal/symbiotic bacteria on one side, which remain strictly extracellular in the intestinal lumen and *bona fide* pathogens that may get internalized into epithelial cells, replicate therein and cross the intestinal barrier. In order to challenge this Manichaeian view of “good” and “bad” bacteria, we screened the gut microbiota to identify non pathogenic bacteria able to get internalized into intestinal cells. We identified several members of the *Lactobacillaceae* family, such as *Ligilactobacillus murinus* or *Limosililactobacillus reuteri*, as potential invaders of enterocytes *in vitro*. We further show that *L. murinus* is able to get internalized in intestinal cells *ex vivo*, *i.e.* in the context of a fully differentiated epithelium covered with mucus. Together, our results highlight a new type of interactions between intestinal cells and bacteria considered as non pathogenic, which may participate to the regulation of the intestinal physiology.

## INTRODUCTION

The interactions between intestinal cells and the bacteria thriving in the intestinal tract can be very diverse. Indeed, bacteria may secrete metabolites which are beneficial for intestinal cells, such as butyrate, a main source of energy for colonocytes (1). In contrast, pathogenic bacteria may secrete toxins, which will interfere with host intestinal physiology, such as Toxin A and B (TcdA and TcdB) from *Clostridioides difficile* (2). Pathogens may in addition cross the mucus layer and adhere to intestinal cells and some bacteria may even get internalized inside cells from the intestinal epithelium (3). Once internalized, bacteria may either target the host cell basolateral membrane and exit to the lamina propria, thereby crossing the intestinal barrier, or replicate inside host cells and eventually spread to neighboring epithelial cells (4).

The type of interactions established between one given bacterial species and intestinal cells can vary depending on environmental cues. Indeed, some bacteria considered as commensals or symbionts may, in response to changes in the intestinal environment, switch to a more “aggressive” behavior and promote disequilibrium in intestinal physiology. Each bacteria could thus be associated with a “pathogenic potential”, whose expression depend on various ecological and physiological parameters of the intestine (5, 6).

Internalization into host cells is not a capacity limited to *bona fide* pathogens. Some bacteria belonging to the oral microbiota, but sometimes considered as opportunistic pathogens, are able to get internalized into epithelial cells. This is the case for *Porphyromonas gingivalis* and for *Fusobacterium nucleatum*, for example (7-9). Along the same line, we have recently identified that *Staphylococcus warneri*, a natural resident from the gut microbiota with a poor “pathogenic potential”, is able to invade intestinal cells (10). These different examples illustrate that the

diversity of gut bacteria that may get internalized into host cells is probably greater than expected.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Cell culture***

Human intestinal Caco2 cells (ATCC HTB-37) were cultivated in Minimum Essential Medium Eagle (MEM; Eurobio) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-Glutamine, 1% non essential amino acids (Sigma-Aldrich) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco). Cells were cultivated in the presence of penicillin ( $1.10^4$  U/mL) and streptomycin (10 mg/mL) (Panbiotech), except during invasion assays.

### ***Bacterial strains***

Strains used in this study were: *Lactobacillus gasseri* (DSM 20243<sup>T</sup>, DSMZ, Germany), *Lactobacillus taiwanensis* (DSM 21401<sup>T</sup>, DSMZ, Germany), *Ligilactobacillus murinus* (formerly *Lactobacillus murinus*; DSM 20452<sup>T</sup>, DSMZ, Germany), *Limosilactobacillus reuteri* (formerly *Lactobacillus reuteri*; DSM 20016<sup>T</sup>, DSMZ, Germany) and *Escherichia coli* (K12 strain). Cecal bacteria were grown on Brain Heart Infusion (BHI) agar plates (BD Biosciences) at 37°C under anaerobic conditions. *Lactobacillaceae* species were grown in modified Man-Rosa-Sharpe (mMRS) broth or agar plates (BD Biosciences) at 37°C, supplemented or not with 5 µg/mL erythromycin. *Escherichia coli* was grown in LB broth or agar plates (BD Biosciences), supplemented or not with 100 µg/mL ampicillin. *Escherichia coli* K12 strain was transformed with the pLI50 plasmid, kindly provided by Chia Lee (Addgene plasmid #13573; <http://n2t.net/addgene:13573>; RRID:Addgene\_13573). *Ligilactobacillus murinus* type strain

was transformed with the pLEM415-*ldhL*-mRFP1 plasmid, kindly provided by Sujin Bao (Addgene plasmid #99842; <http://n2t.net/addgene:99842>; RRID:Addgene\_99842). The protocol used to transform *Ligilactobacillus murinus* was described in (11).

### ***Preparation of cecal contents***

Animal care and experimentation were approved by a regional Animal Experimentation Ethics Committee (APAFIS#21102–2019061810387832 v2) and complied with the guidelines of the European Commission for the handling of laboratory animals (Directive 2010/63/EU). All efforts were made to minimize suffering of animals. Eight-weeks-old C57Bl/6JRj male mice (Janvier Labs, Le-Genest-Saint-Isle, France) were housed at 23°C (5 animals/cage) with a 12-h light-dark cycle in regular open cages. All animals were fed with a non-sterilized standard rodent diet (3430.PM.S10, Serlab, France). Drinking water was not sterilized. After 1 week of acclimatization to the animal facility, animals were euthanized by an intraperitoneal injection of an overdose of ketamine (200 mg/kg BW) and xylazine (20 mg/kg BW). Segments of the colon were then removed to perform *ex vivo* invasion assays. Cecal contents were in parallel recovered, weighted and frozen at -80°C or resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) (150 mg/mL) and centrifugated for 20 seconds at 30xg to remove food remnants. Supernatants, containing cecal bacteria, from 4-5 independent mice were then pooled and directly added to cell culture media to perform invasion assays.

### ***Invasion assays in Caco2 cells***

Caco2 were seeded at a density of  $1.6 \times 10^5$  cells per  $\text{cm}^2$  the day before invasion assays. Cells were cultivated in FCS- and antibiotics-free culture media for 1 h before the addition of bacteria. For invasion assays using cecal contents, pooled suspensions of cecal contents from 4-5

independent mice (150 mg/mL) were added to cell culture media (17  $\mu$ L of suspension for  $1 \times 10^6$  cells). For invasion assays using pure cultures of bacteria, bacteria grown overnight in stationary phase were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), added to cells at a multiplicity of infection (MOI) of 100. Cells co-incubated with bacteria were centrifuged for 3 min at 80xg and then incubated at 37°C. After 1 h of co-incubation, cells were washed twice with PBS 1x and incubated with FCS-containing fresh medium supplemented with 50  $\mu$ g/ml gentamicin (Euromedex) and 50  $\mu$ g/ml imipenem (Sigma-Aldrich) to kill extracellular bacteria. 1h after the beginning of the co-incubations, cells were washed three times with PBS 1x and lysed with PBS–0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). The number of viable intracellular bacteria was assessed by plating cell lysates on agar plates.

### ***Invasion assays in cecal tissues***

2 cm-long colon segments were removed from euthanized mice. Colon contents were eliminated by flushing the colon lumen with 1 mL HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution; Sigma-Aldrich). Colon segments were then ligated on one extremity. Bacteria grown overnight in stationary phase were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in HBSS and injected in the lumen of colon segments ( $\sim 2 \cdot 10^9$  bacteria in 200  $\mu$ L of HBSS/segment). Colon segments were finally ligated at the second extremity and incubated in DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12) (Eurobio) for 2 h at 37°C. After incubation, colon segments were opened longitudinally, washed three times in DMEM/F12 and incubated for 2 hours at 37°C in DMEM/F12 supplemented with 50  $\mu$ g/ml gentamicin (Euromedex) and 50  $\mu$ g/ml imipenem (Sigma-Aldrich) to kill extracellular bacteria. Colon segments were washed again three times in DMEM/F12 and grinded in PBS. The obtained

lysates were plated on agar plates containing 100 µg/mL ampicillin or 5 µg/mL erythromycin to detect *E. coli*/pLI50 and *L. murinus*/pLEM415-mldhL-mRFP1, respectively.

### ***Identification of internalized bacteria***

Colonies obtained after *in vitro* invasion assays were randomly picked and lysed in 200 µL of 10 mM Tris pH 8.0, 0.5 mM EDTA, Triton X-100 1%, Tween 20 0.5%. Bacterial lysates were then boiled 15 min at 100°C and centrifugated 5 min at 10,000 rpm. 2 µL of the resulting supernatants, containing bacterial DNA, were used to amplify by PCR 16S rRNA genes using Eub-515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') and Eub-806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') primers. Final concentrations were as follow: HF buffer 1X; primers 0.8 µM; dNTPs 0.2 mM, Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs) 0.5 U. Thermocycling conditions were as follow: initiation step 30 s min at 98°C; cycling stage: 10 s at 98°C, 30 s at 53°C, 30 s at 72°C, 35 cycles. Amplification products were then sequenced using the Eub-515F primer and taxonomic identification was finally performed using Ribosomal Database Project softwares (12).

## RESULTS

### *Identification of bacteria from the murine gut microbiota able to invade intestinal cells.*

In order to identify new bacterial species belonging to the gut microbiota and able to invade intestinal cells, we designed a screening method based on gentamicin-protection assays (Fig. 1A) (13). Bacteria from the cecal content of pathogen-free mice were collected and co-incubated for one hour with human Caco2 cells *in vitro*. Extra-cellular bacteria were then eliminated by extensive washing of cells and addition of a mix of gentamicin and imipenem in the cell culture medium (these two antibiotics do not cross efficiently eukaryotic membranes and thus do not kill intracellular bacteria). Caco2 cells were then lysed and cell lysates (potentially containing intracellular bacteria) were spread on BHI agar plates. CFUs (Colony-Forming Units) obtained after three days of incubation at 37°C under anaerobic conditions were randomly picked and identified by 16S rRNA sequencing (Fig. 1B). Interestingly, we identified a high proportion of bacteria belonging to the *Lactobacillaceae* family (76%, 53/70 CFUs), and more particularly to the *Lactobacillus* genus (61%, 43/70 CFUs), as potential invaders of intestinal cells.

### *Internalization efficiency of Lactobacillaceae in Caco2 cells*

In order to confirm the ability of bacteria from the *Lactobacillaceae* family to get internalized into intestinal cells, pure cultures from various *Lactobacillaceae* species (*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus taiwanensis*, *Ligilactobacillus murinus* and *Limosilactobacillus reuteri*) were grown in stationary-phase in mMRS broth and added on Caco2 cells to perform gentamicin/imipenem-protection assays (Multiplicity of Infection [MOI] of 100). We used in parallel *E. coli* (K12) as a negative control, as this species is considered as non-invasive.

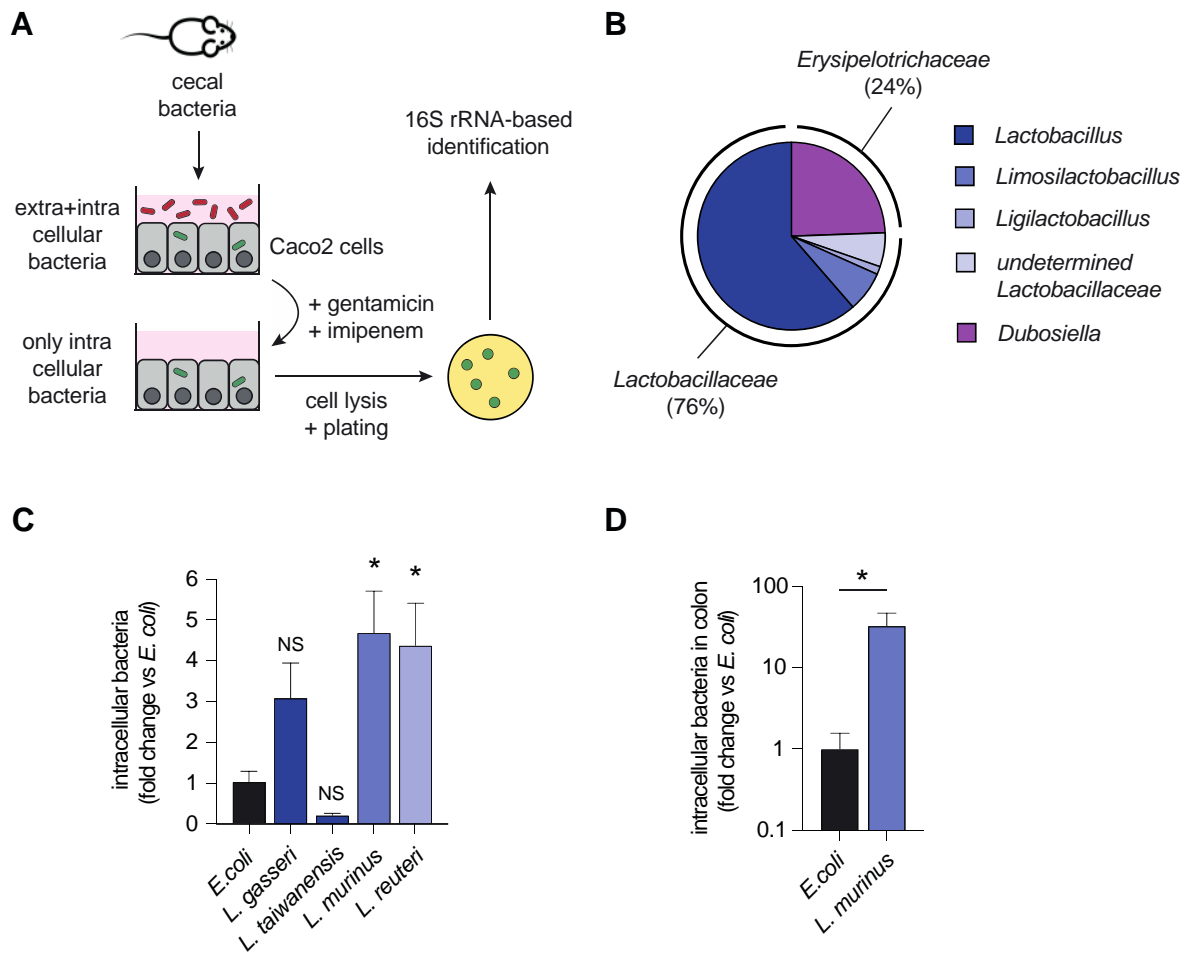
We observed that *L. murinus* and *L. reuteri* have a significantly higher level of internalization in Caco2 cells compared to *E. coli* (x7 and x6, respectively) (Fig. 1C). These results confirm our initial screen and highlight that some *Lactobacillaceae* species have the ability to invade intestinal cells *in vitro*.

### ***Internalization of L. murinus in intestinal tissues ex vivo***

In order to evaluate the ability of *L. murinus* to invade intestinal cells in the context of a fully differentiated, mucus-secreting epithelium, we isolated mouse colon segments and co-incubated them with bacteria. After 2h hours of incubation, colon segments were opened longitudinally, extensively washed and incubated for 2 hours in medium supplemented with gentamicin and imipenem to kill extracellular bacteria. Colonic tissues were finally lysed and plated on agar plates to recover potential intracellular bacteria. For these experiments, we compared the internalization efficiency of *E. coli* and *L. murinus* transformed with plasmids conferring resistance to ampicillin (pLI50; (14)) and erythromycin (pLEM415-*ldhL*-mRFP1; (11)), respectively.

We observed a significantly higher level of intracellular bacteria for *L. murinus* compared to *E. coli* (x32), suggesting that this *Lactobacillaceae* species can invade cells in the context of a fully differentiated intestinal epithelium covered with mucus (Fig 1D).





**Figure 1: *Lactobacillaceae* from the gut microbiota can invade intestinal cells.**

A, Description of the gentamicin/imipenem-protection assays used to identify invading bacteria from mouse cecal microbiota. B, Frequencies of identified intracellular bacteria from two independent screening. C, Quantification of intracellular bacteria in Caco2 cells, expressed as fold-change versus *E. coli* (mean  $\pm$  s.e.m.;  $n=5-9$ ; NS, not significant; \*,  $P<0.05$  vs *E. coli*; one way ANOVA, with Holm-Sidak's correction). D, Quantification of bacteria internalized in colon segments *ex vivo*, expressed as fold-change versus *E. coli* (mean  $\pm$  s.e.m.;  $n=3$ ; \*,  $P<0.05$ ; two-tailed paired t-test).

## DISCUSSION

We demonstrate in this study that several bacterial species belonging to *Lactobacillaceae* are able to get internalized *in vitro*, into intestinal cell lines, as well as *ex vivo*, in a fully differentiated intestinal epithelium.

The *Lactobacillaceae* family have recently been reclassified and includes now 25 independent genera with high genetic, phenotypic and ecological diversity (15). *Lactobacillaceae* are generally recognized as displaying functional characteristics that contribute to gut health (16). They colonize multiple areas of the human body such as the digestive tract or the female genital tract (17). Many different strains of *Lactobacillaceae* are currently used as probiotics and their beneficial impact on human diseases, including intestinal inflammatory diseases, are under high scrutiny (16). Interestingly, *Lactobacillaceae* have been very rarely associated with pathogenicity, although some examples of bacteremia and endocarditis due to *Lactobacillus* species have been reported (18). In the frame of our work, it would be particularly interesting to determine whether these examples of infections are due to strains of *Lactobacillaceae* exhibiting high capacities of internalization.

The molecular mechanisms used by *Lactobacillaceae* to invade intestinal cells remain uncharacterized. Several *Lactobacillaceae* were actually shown to be able to adhere to both mucus and epithelial cells (19). The mechanisms involved in these adhesion events rely on the presence of glycoprotein surface layers (also known as S-layers), the expression of LPXTG proteins or the protrusion of pili from the bacterial cell wall. Whether this ability to adhere to intestinal cells is a pre-requisite for further internalization and whether *Lactobacillaceae* adhesion molecules are directly involved in invasion of intestinal cells remain to be characterized.

Interestingly, several studies have reported the ability of *Lactobacillaceae* to cross the intestinal barrier and to disseminate into deeper tissues. *L. johnsonii*, for example, was detected in multiple systemic tissues in MyD88<sup>-/-</sup> mice (20). In particular, it can persist in dendritic cells and exert immunomodulatory effects on the intestinal epithelium (20). Once again, the role of *Lactobacillaceae* internalization in these events of translocation across the intestinal barrier and in the immunoregulation of the intestinal epithelium remain to be fully characterized.

Our work, by unveiling the ability of bacteria generally considered as non pathogenic to invade intestinal cells now open new research avenues to decipher the physiological consequences of this new type of close interactions between bacteria from the gut microbiota and intestinal cells.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by INSERM, Rouen University, the iXcore Foundation for Research and the Regional Council of Normandie (RIN Recherche 2019 Emergent). Europe gets involved in Normandie with the European Regional Development Fund (ERDF). Funding bodies played no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

## REFERENCES

1. Roediger WE. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*. 1980;21(9):793-8.
2. Martinez-Melendez A, Cruz-Lopez F, Morfin-Otero R, Maldonado-Garza HJ, Garza-Gonzalez E. An Update on *Clostridioides difficile* Binary Toxin. *Toxins (Basel)*. 2022;14(5).
3. Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect*. 2015;17(3):173-83.
4. Dowd GC, Mortuza R, Ireton K. Molecular Mechanisms of Intercellular Dissemination of Bacterial Pathogens. *Trends Microbiol*. 2021;29(2):127-41.
5. Casadevall A. The Pathogenic Potential of a Microbe. *mSphere*. 2017;2(1).
6. Jochum L, Stecher B. Label or Concept - What Is a Pathobiont? *Trends Microbiol*. 2020;28(10):789-92.
7. Pan C, Liu J, Wang H, Song J, Tan L, Zhao H. *Porphyromonas gingivalis* can invade periodontal ligament stem cells. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):38.
8. Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, *et al*. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun*. 2000;68(6):3140-6.
9. Lamont RJ, Yilmaz O. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol 2000*. 2002;30:61-9.
10. Louail R, Florin F, Bernard S, Michaud JB, Breton J, Achamrah N, *et al*. Invasion of intestinal cells by *Staphylococcus warneri*, a resident of the human gut microbiota. 2022.
11. Bao S, Zhu L, Zhuang Q, Wang L, Xu PX, Itoh K, *et al*. Distribution dynamics of recombinant *Lactobacillus* in the gastrointestinal tract of neonatal rats. *PLoS One*. 2013;8(3):e60007.

12. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D633-42.
13. Elsinghorst EA. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol.* 1994;236:405-20.
14. Lee CY, Buranen SL, Ye ZH. Construction of single-copy integration vectors for *Staphylococcus aureus*. *Gene.* 1991;103(1):101-5.
15. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz C, Harris HMB, Mattarelli P, *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020;70(4):2782-858.
16. Dempsey E, Corr SC. *Lactobacillus* spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Front Immunol.* 2022;13:840245.
17. Heeney DD, Gareau MG, Marco ML. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr Opin Biotechnol.* 2018;49:140-7.
18. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(1):31-40.
19. Celebioglu HU, Svensson B. Dietary Nutrients, Proteomes, and Adhesion of Probiotic Lactobacilli to Mucin and Host Epithelial Cells. *Microorganisms.* 2018;6(3).
20. Udayan S, Stamou P, Crispie F, Hickey A, Floyd AN, Hsieh CS, *et al.* Identification of Gut Bacteria such as *Lactobacillus johnsonii* that Disseminate to Systemic Tissues of Wild Type and MyD88<sup>-/-</sup> Mice. *Gut Microbes.* 2022;14(1):2007743.

# Discussion

## Limite des modèles expérimentaux

Nos travaux ont permis d'identifier que *Staphylococcus warneri* est une bactérie résidente du microbiote intestinal humain, possédant la capacité de pénétrer dans les cellules intestinales humaines *in vitro*. Cette capacité d'internalisation de *S. warneri* est dépendante d'un remodelage des filaments d'actine de la cellule hôte et semble impliquer des protéines exprimées spécifiquement durant la phase stationnaire de croissance de la bactérie. Nos travaux ont également montré que certaines *Lactobacillaceae* du microbiote comme *Ligilactobacillus murinus* ou *Limosilactobacillus reuteri* partageait cette capacité d'internalisation dans les cellules intestinales *in vitro*.

Il est important de noter que nos résultats se sont pour l'instant limités à l'étude *in vitro* de l'internalisation de bactéries dans des mono-cultures de lignées cellulaires épithéliales immortalisées. Ces conditions expérimentales sont associées à plusieurs biais :

1) Les lignées cellulaires immortalisées utilisées sont des lignées dérivées de tumeurs dont le phénotype peut différer par rapport aux cellules de l'épithélium intestinal en conditions physiologiques (Engle *et al.*, 1998 ; Hsu et Sabatini, 2008 ; Devriese *et al.*, 2014). Ainsi, les lignées cellulaires immortalisées peuvent surexprimer certaines protéines permettant l'internalisation des bactéries *in vitro*. A l'inverse il se peut que des protéines essentielles à l'internalisation des bactéries *S. warneri*, *L. murinus* et *L. reuteri* soient faiblement exprimées dans les lignées tumorales par rapport aux cellules de l'épithélium intestinal, conduisant à une sous-estimation de l'efficacité de l'internalisation de ces espèces dans notre étude.

2) L'utilisation de mono-cultures de type Caco2 ou T84 ne permet pas d'étudier le rôle de la couche de mucus normalement présente dans l'intestin. Celle-ci limite normalement les contacts directs entre les bactéries du microbiote intestinal et la surface des cellules de l'épithélium intestinal. L'absence de mucus dans nos conditions *in vitro* « facilitent » donc le contact direct des bactéries avec la surface des cellules épithéliales. En conditions physiologiques, l'efficacité d'internalisation de *S. warneri*, *L. murinus* et *L. reuteri* pourrait être moins importante. Si certaines bactéries telle que *Akkermansia muciniphila* sont connues pour être capables de dégrader la couche de mucus (Aggarwal *et al.*, 2022), ni *S. warneri*, ni *L.*

*murinus*, ni *L. reuteri* ne sont mentionnées dans la littérature comme des étant mucinophiles. L'ajout de cellules sécrétrices de mucus, comme les cellules HT29-MTX, à nos cultures de Caco2 et de T84 pourrait permettre de reconstituer un modèle d'épithélium possédant une couche de mucus et de déterminer si *S. warneri*, *L. murinus* et *L. reuteri* sont capables de s'internaliser malgré celle-ci et, si oui, dans quelles proportions. Même si les bactéries identifiées dans notre étude ne sont pas connues pour dégrader le mucus, la présence de ce dernier n'est pas forcément rédhibitoire pour l'internalisation. En effet, certaines bactéries pathogènes comme *Salmonella enterica* ont une efficacité d'internalisation plus importante dans un modèle de culture de cellules incluant des HT29-MTX (sécrétant du mucus) que dans un modèle de culture de cellules Caco2 (Gagnon *et al.*, 2012). D'autre part, *in vivo*, l'épaisseur de la couche de mucus varie en fonction de la localisation dans l'intestin, ainsi si le colon distal possède une épaisse couche de mucus, le colon proximal possède une couche de mucus plus mince, pouvant favoriser les interactions directes entre bactéries du microbiote et entérocytes (Kamphuis *et al.*, 2017). Enfin, il existe certaines situations pathologiques, comme dans le cas des MICI, pour lesquelles l'épaisseur de la couche de mucus est fortement diminuée (van der Post *et al.*, 2019), ce qui pourrait favoriser les contacts directs bactéries-cellules épithéliales intestinales.

3) Notre modèle est un modèle mono-cellulaire d'entérocytes où l'on ne s'intéresse donc qu'à ce seul type cellulaire. Nous avons montré que *S. warneri*, *L. murinus* et *L. reuteri* étaient capables de s'internaliser dans différentes lignées épithéliales intestinales (Caco 2 et T84) avec des efficacités différentes. Nous pouvons par conséquent nous poser la question de la capacité de ces bactéries à envahir d'autres types cellulaires de l'épithélium intestinal (cellules caliciformes, cellules entéro-endocrines, cellules de Paneth, cellules Tuft, cellules M et cellules souches). Les pathogènes connus pour s'internaliser dans les cellules intestinales montrent un tropisme particulier pour certains types cellulaires. Ce tropisme est déterminé par le(s) récepteur(s) cellulaire(s) reconnu(s) par les bactéries et induisant leur internalisation. Par exemple, *L. monocytogenes* s'internalise préférentiellement dans les cellules caliciformes qui présentent une accessibilité plus importante de l'E-cadhérine (le récepteur de la protéine bactérienne d'InlA) comparativement aux entérocytes (Nikitas *et al.*, 2011), alors que *Salmonella enterica* cible préférentiellement les entérocytes (Li, 2022).



4) En lien avec le point précédent, en n'utilisant qu'un seul type cellulaire, il manque à notre modèle les signaux que s'échangent les différentes cellules intestinales. Notamment, l'absence de cellules immunitaires dans notre système introduit un biais par rapport à la situation *in vivo* (Puschhof *et al.*, 2021). L'utilisation de modèle de co-cultures plus complexes, d'organoïdes et/ou de système de type « gut-on-chip », incorporant des cellules immunitaires, constituerait un système intéressant pour intégrer la diversité des types cellulaires et évaluer l'impact de l'internalisation de *S. warneri*, *L. murinus* et *L. reuteri* sur la physiologie des cellules et de l'intestin.

5) Notre étude de la capacité d'internalisation des bactéries du microbiote a été évaluée en utilisant des cultures pures de bactéries isolées. Or le microbiote intestinal héberge une communauté de plusieurs centaines d'espèces bactériennes différentes qui communiquent entre-elles (Qin *et al.*, 2010). Plusieurs études montrent que l'internalisation de certaines espèces bactériennes dans les cellules épithéliales peut être favorisée par d'autres espèces environnantes. *Campylobacter jejuni*, par exemple, est capable d'induire l'internalisation d'*E. coli* au sein de cellules T84. Ce mécanisme passe par une augmentation de la concentration de cholestérol à la surface de la cellule épithéliale, entraînant l'internalisation de *E. coli* au niveau de radeaux lipidiques (Kalischuk 2009). Cette capacité de bactérie à favoriser l'internalisation d'autres bactéries apparaît également chez *Fusobacterium nucleatum* (Edwards *et al.*, 2006). Dans des cellules épithéliales de type KB et dans des kératinocytes oraux de type TERT-2, *F. nucleatum* est capable d'augmenter l'adhésion et de favoriser l'internalisation de *Streptococcus cristatus*. *S. cristatus* est une bactérie connue pour adhérer faiblement aux cellules humaines sans être capable de rentrer à l'intérieur de celles-ci. Le mécanisme semble impliquer l'adhésion mutuelle de *F. nucleatum* avec *S. cristatus*. Cette adhésion passe par le biais des pili de *S. cristatus*. L'entrée de *S. cristatus* se fait ensuite grâce à la capacité de *F. nucleatum* à pénétrer dans les cellules de la cavité orale, par un mécanisme jusqu'à aujourd'hui mal caractérisé (Edwards *et al.*, 2006).

D'autre part, l'environnement intestinal comporte un grand nombre de virus. Si ceux-ci sont souvent laissés de côté dans les études sur le microbiote (Oh *et al.*, 2019), les bactériophages, notamment, ont une grande influence sur la physiologie des bactéries et pourraient influencer la capacité d'internalisation de celles-ci bactéries en jouant par exemple sur l'expression de facteurs d'adhésion, d'internalisation ou de survie intracellulaire

(Rabinovich *et al.*, 2012). Incorporer une analyse métagénomique des éventuels phages présents dans les bactéries capables de s'internaliser permettrait d'établir s'il existe un apport viral qui peut expliquer les différences d'efficacité d'internalisation entre souches ou espèces proches.

6) Les conditions de cultures *in vitro* des bactéries isolées du microbiote (milieu de culture utilisé, pH, oxygénation, etc...) ont une influence importante sur l'expression des gènes bactériens Blair *et al.*, 2013). Il en est de même pour les cellules eucaryotes cultivées *in vitro* (Hara *et al.*, 1993). Il est possible que dans l'environnement caecal (à partir duquel nous avons initialement criblé nos bactéries), les conditions étaient plus favorables à l'internalisation des bactéries comparées aux conditions que nous avons utilisées *in vitro* (en permettant une expression plus importante des protéines impliquées dans l'internalisation). L'efficacité d'internalisation observée *in vitro* pour ces bactéries est donc peut-être sous-estimée par rapport à la situation *in vivo*.

7) Le test d'internalisation utilisé dans nos études repose sur le principe que la gentamicine et l'imipénem ne pénètrent pas à l'intérieur des cellules eucaryotes. Certains travaux ont en effet montré que, lors de l'ajout de gentamicine à une concentration de 50 µg/mL dans le milieu de culture de cellules TH1, la concentration intracellulaire de gentamicine restait inférieure à 0,1 µg/mL (Lecaroz *et al.*, 2006). Si ces données vont dans le sens d'une faible pénétration de la gentamicine dans les cellules, il ne peut pas être formellement exclu que même une faible concentration intracellulaire de gentamicine puisse affecter les bactéries s'étant internalisées. Il a été montré que la survie intracellulaire de *Yersinia pestis* dans des macrophages était impactée par des concentrations croissantes de gentamicine ajoutée dans le milieu de culture des cellules (VanCleave *et al.*, 2017). A une concentration de 32 µg/mL, la survie à 3h était inférieure de moitié à celle observée à une concentration de 1 µg/mL. Ces résultats suggèrent que le nombre de bactéries intracellulaires quantifiées lors d'un test utilisant la gentamicine peut être sous-estimé. Dans le cas de l'imipénem, il n'existe pas d'études ayant étudié l'impact potentiel d'une faible quantité intracellulaire de cet antibiotique sur la survie des bactéries intracellulaires. Pour éviter ces problèmes de traces résiduelles d'antibiotiques intracellulaires, d'autres tests d'internalisation ont été mis au point. C'est le cas par exemple pour l'étude de l'internalisation des Staphylocoques où la lysostaphine (une endopeptidase

ciblant le peptidoglycane) est utilisé comme alternative à la gentamicine pour tuer les bactéries extracellulaires (Kim *et al.*, 2019). Nous avons essayé ce type d'approche dans notre étude de l'internalisation de *S. warneri*. Malheureusement, la lysostaphine ne semble pas avoir d'effet bactéricide sur *S. warneri*.

Un modèle plus adapté pour nos études serait de détecter des événements d'internalisation de *S. warneri*, *L. murinus* et *L. reuteri* directement *in vivo*. Une approche possible serait d'administrer nos bactéries candidates par voie orale à des souris, puis de récupérer des segments intestinaux après quelques jours pour détecter la présence de bactéries intracellulaires dans les cellules de l'épithélium intestinal. Ce type d'approche nécessite de pouvoir « suivre » spécifiquement les bactéries candidates administrées initialement par voie orale. Ceci est possible par exemple si les souches testées sont transformées pour leur faire acquérir une résistance à un antibiotique. Une autre possibilité serait de transformer les bactéries candidates pour leur faire exprimer une protéine fluorescente afin de les détecter par la suite par immunofluorescence sur des coupes de tissus intestinaux. Dans le cas de *S. warneri*, il n'existe que très peu d'études ayant réussi à transformer cette espèce. Nos essais pour transformer cette espèce bactérienne, via l'utilisation de protocoles adaptés à la transformation de *S. aureus* ou d'autres staphylocoques (Monk *et al.*, 2012 ; Brückner, 2006), se sont effectivement avérés difficiles.

Dans le cas des *Lactobacillaceae*, nous avons réussi à transformer différentes espèces pour leur conférer une résistance à l'érythromycine. Ces souches, que nous avons utilisées dans des modèles *ex vivo*, vont maintenant pouvoir être testées *in vivo*.

Une autre approche intéressante serait de pouvoir détecter directement des bactéries du microbiote s'étant naturellement internalisées dans les cellules intestinales (sans « administration » orale préalable de bactéries candidates). Une possibilité serait de réussir à extraire l'ensemble des ADN des cellules de segments intestinaux traités à la gentamicine (comprenant donc potentiellement l'ADN de bactéries intracellulaires) et de séquencer ceux-ci pour identifier les bactéries internalisées. Un des problèmes majeurs avec ce type d'approche est la contamination potentielle avec des ADN de bactéries du microbiote non internalisées. En effet, l'utilisation de gentamicine permet de tuer les bactéries extracellulaires mais pas d'éliminer complètement leur ADN qui peut alors adhérer de façon non spécifique sur les

cellules intestinales ou éventuellement être endocyté et être détecté au même titre que les ADN de bactéries intracellulaires.

## Internalisation de *Staphylococcus warneri*

Nous avons pu établir que la bactérie *S. warneri* est naturellement présente au sein du microbiote intestinal chez l'Homme et la Souris et est capable de s'internaliser *in vitro* dans des cellules épithéliales humaines.

*S. warneri* est une bactérie connue pour être présente dans le microbiote cutané. C'est une bactérie appartenant aux CoNS, parfois qualifiée de pathogène opportuniste car elle a été mise en cause dans des cas d'endocardites (Kuvhenguhwa *et al.*, 2017), de méningites (Incani *et al.*, 2010), d'infections de prothèses (Bogut *et al.*, 2014) et d'infections chez les enfants prématurés (Cimiotti *et al.*, 2007). La pathogénicité de cette bactérie reste cependant limitée par rapport à d'autres CoNS comme *S. epidermidis* ou *S. haemolyticus*. Il a été mis en évidence que cette bactérie était également retrouvée le long du tractus gastro-intestinal chez l'Homme et plus particulièrement chez les nouveaux nés et les prématurés (Mahenthiralingam, 2009 ; Hu *et al.*, 2012 ; Hira *et al.*, 2013). Cette bactérie a également été identifiée dans le microbiote intestinal d'autres Mammifères, notamment la souris (Liu *et al.*, 2020). A notre connaissance, une seule étude, à ce jour, a montré la capacité de *S. warneri* à adhérer et pénétrer dans des cellules humaines de type HeLa (Szczyka *et al.*, 2016). Les souches utilisées dans cette étude étaient isolées de patients présentant une bactériémie et présentaient des résistances aux antibiotiques. Sur 23 souches testées toutes étaient capables d'adhérer aux cellules Hela et 10 (43,5%) étaient capables de s'internaliser, avec des efficacités variables. En revanche, aucun mécanisme d'internalisation n'a été caractérisé. De manière générale, *S. warneri* ne disposant pas de système de sécrétion de types 3, nous nous attendons à ce que cette bactérie s'internalise par un mécanisme de type « Zipper », à l'image ce qui est proposé pour *S. aureus* (Bur *et al.*, 2013).

## Implication potentielle des autolysines dans l'internalisation de *Staphylococcus warneri*

Chez les Staphylocoques, le mécanisme d'internalisation le mieux caractérisé est celui de *S. aureus* impliquant les protéines FnBP. Contrairement à *S. aureus*, *S. warneri* ne présente pas de protéines homologues à FnBP. En parallèle de cette voie majoritaire, il existe des voies alternatives d'internalisation utilisées par *S. aureus*, comme celle reposant sur des autolysines. Plusieurs autolysines ont été identifiées dans le genre *Staphylococcus* parmi lesquelles : Atl et Aaa chez *S. aureus* (Hirschaussen *et al.*, 2010 ; Hirschaussen *et al.*, 2012), AtlE chez *S. epidermidis* (Hirschaussen *et al.*, 2010), AtlL chez *S. lugdunensis* (Pereira *et al.*, 2012), AtlC chez *S. caprae* (Alignet *et al.*, 2002) et Aas chez *S. saprophyticus* (Hell *et al.*, 1998). *S. warneri* possède également une autolysine, nommée Atl<sub>WM</sub> (Yokoï *et al.*, 2008). Chez *S. aureus*, Aaa a été montrée comme permettant l'adhésion mais pas l'internalisation de la bactérie, alors que Atl permet à la fois l'adhésion et l'internalisation. L'efficacité d'internalisation médiée par Atl est cependant faible en comparaison de celle médiée par la FnBP. Chez *S. epidermidis*, il existe également une internalisation médiée par l'autolysine AtlE qui semble être le mécanisme majoritaire (Hirschaussen *et al.*, 2010). Le récepteur reconnu par les autolysines Atl et AtlE à la surface des cellules hôte est la protéine Hsc70 (pour Heat shock 70), une protéine impliquée dans l'apoptose. Dans le cas de *S. warneri*, l'autolysine Atl<sub>WM</sub> semble donc être un candidat potentiel impliqué dans l'internalisation de cette bactérie. *S. warneri* étant une bactérie difficilement transformable, nous n'avons pas pu générer de mutant  $\Delta atl_{WM}$ . Nous avons donc essayé de bloquer l'expression du récepteur Hsc70 dans les cellules hôtes via l'utilisation de siRNA anti-Hsc70. Cependant, nous n'avons obtenu qu'une inhibition partielle de l'expression de Hsc70 qui n'était pas suffisante pour bloquer l'internalisation de *S. epidermidis* qui utilise ce récepteur. Nous ne pouvons par conséquent pas conclure sur l'implication du couple Atl<sub>WM</sub>/Hsc70 dans l'internalisation de *S. warneri* au sein de l'épithélium intestinal.

## Stratégies potentielles d'identification des mécanismes d'internalisation de *S. warneri*

Nous avons observé une efficacité d'internalisation de *S. warneri* plus importante pour les bactéries cultivées en phase stationnaire que pour celles cultivées en phase exponentielle. Dans le cas de *S. aureus*, il a été montré que l'expression des autolysines Aaa et Atl étaient corrélée négativement avec l'expression de Agr, une protéine clef du quorum sensing dont la

concentration est maximale en phase stationnaire (Hirschaussen *et al.*, 2012). En conséquence, les capacités d'adhésion de *S. aureus* en phase stationnaire sont plus faibles qu'en phase exponentielle. Dans le cas d'un mutant  $\Delta agr$ , l'adhésion est au contraire plus forte en phase stationnaire qu'en phase de croissance (Pöhlmann-Dietze *et al.*, 2000). L'effet de la protéine Agr pourrait également être lié au contrôle de l'expression des gènes impliqués dans la formation de la capsule polysaccharidique de *S. aureus*. Cette capsule pourrait inhiber la capacité d'internalisation de *S. aureus* en « recouvrant » les protéines MSCRAMM et en empêchant leur interaction avec leurs récepteurs sur les cellules hôtes. La question se pose donc pour *S. warneri* de savoir si l'expression d'Agr a une influence sur sa capacité d'internalisation, par exemple en régulant l'expression d'Atl<sub>WM</sub> et si la présence d'une capsule (identifiée chez certaines souches de *S. warneri* ; Poutrel *et al.*, 1990) régule également ce mécanisme.

Le fait que *S. warneri* s'internalise plus efficacement en phase stationnaire pourrait nous être utile pour identifier les protéines bactériennes impliquées dans l'entrée de cette bactérie dans les cellules hôtes. Une comparaison du transcriptome de *S. warneri* cultivées en phase exponentielle de croissance par rapport à des *S. warneri* cultivées en phase stationnaire nous permettrait en effet d'établir une liste de protéines candidates (en se focalisant sur les protéines exprimées à la surface de la bactérie). Une approche non dirigée, par mutagénèse aléatoire, afin d'établir une banque de mutants serait intéressante pour identifier un mutant dont la capacité d'internalisation est altérée. La difficulté à transformer *S. warneri* rend cependant cette approche peu faisable.

Nous avons mené nos expériences d'internalisation en cultivant *S. warneri* en condition aérobie. Cette aérobose induit nécessairement une expression différente des protéines de *S. warneri* comparée aux conditions d'anaérobose existant au sein du microbiote intestinal. Nous avons effectué quelques expériences préliminaires de culture de *S. warneri* en conditions anaérobies. Nous avons observé que la croissance de *S. warneri* est ralentie dans ces conditions. La possibilité d'effectuer le protocole d'internalisation avec des teneurs réduites (mais non nulles) d'O<sub>2</sub>, entre 1% et 4% d'O<sub>2</sub>, permettrait de reproduire plus fidèlement l'environnement intestinal à proximité des cellules épithéliales (qui reçoivent de l'oxygène par la circulation sanguine) et d'étudier l'impact de cette « micro-aérobose » sur l'internalisation de *S. warneri*.

La capacité d'internalisation des Staphylococcus peut enfin varier si les bactéries sont sous forme « planctonique » ou impliquées dans un biofilm. Dans le cas de *S. aureus*, les bactéries en biofilm présentent une efficacité d'internalisation moins importante que celles sous

forme planctonique (Bohl *et al.*, 2021). L'hypothèse la plus simple est que la matrice du biofilm masque ou rend difficile d'accès les MSCRAMM bactériennes.

En parallèle de ces approches visant à identifier les protéines de *S. warneri* impliquées dans l'internalisation, nous pourrions envisager de cibler les cellules hôtes en utilisant différents inhibiteurs des voies de signalisation connues pour participer à l'internalisation des bactéries comme par exemple la myosine (Pillon et Doublet, 2021), les microtubules (Oelschlaeger *et al.*, 1993), les septines (Mostowy, 2009) ou la clathrine (Latomanski et Newton, 2019).

Il a été montré que certaines « amines traces » (ou TA pour Trace Amine), comme la tyramine, la tryptamine ou la phenylethylenamine, favorisaient l'internalisation de plusieurs espèces de *Staphylococcus* au sein de cellules HT29 et de lignées primaires de l'épithélium intestinal murin (Luqman *et al.*, 2018 et 2019). Ces TA peuvent être produites par les *Staphylococcus* eux-mêmes, comme dans le cas de *S. aureus*, grâce à une enzyme nommée SadA (pour Staphylococcal aromatic amino acid decarboxylase). Le mécanisme impliqué est distinct de la voie principale de l'internalisation de *S. aureus* par les FnBP et passe soit par l'activation du récepteur de la sérotonine, soit par l'activation du récepteur adrénergique  $\alpha_2$  à la surface des HT29, entraînant ensuite un remodelage du cytosquelette d'actine. La capacité de production de TA par *S. warneri* reste actuellement inconnue. Des essais préliminaires réalisés au laboratoire n'ont montré aucun effet potentialisateur de la tryptamine, de la tyramine, de l'épinéphrine ou de la sérotonine sur l'internalisation de *S. warneri* dans des Caco2 ou des T84.

## Capacité d'internalisation des *Lactobacillaceae*

Nous avons mis en évidence lors de nos travaux que certaines bactéries de la famille des *Lactobacillaceae* possédaient la capacité de s'internaliser. Ainsi, dans le panel d'espèces testées, *L. murinus* et *L. reuteri* semblent présenter une capacité d'internalisation significativement plus importante qu'une souche considérée comme non invasive telle que *E.*

*coli* K12. Certaines espèces, en revanche, comme *L. taiwanensis* semblent incapable de s'internaliser dans des cellules Caco2.

*L. murinus* est une bactérie présente dans le tractus digestif de rat et de souris (Hemme *et al.*, 1980). Cette espèce bactérienne semble exercer plusieurs effets bénéfiques sur la physiologie intestinale comme un effet protecteur vis à vis de l'entérocolite nécrosante chez le rat (Isani *et al.*, 2018), une amélioration de la perméabilité intestinale et une diminution de l'inflammation chronique dans des modèles murins (Pan *et al.*, 2018).

Il existe dans la littérature plusieurs exemples de translocation de *L. murinus* à travers la barrière intestinale, mais aucun mécanisme n'a été décrit pour expliquer ces observations (Udayan *et al.*, 2022). Dans des modèles murins axéniques, *L. murinus* présente un taux de translocation de la lumière intestinale vers les ganglions lymphatiques supérieur à celui de nombreuses autres bactéries, notamment *S. epidermidis* et *L. acidophilus* (Ma *et al.*, 1990). De manière intéressante, *L. taiwanensis* possède au contraire une faible capacité de translocation à travers la barrière intestinale (Morikawa *et al.*, 2016). Il a été proposé que cette différence soit due aux cellules phagocytaires de l'épithélium intestinal de souris qui internalisent de manière plus importante *L. murinus* que *L. taiwanensis*, sans que la proportion de ces espèces dans l'intestin de souris ne justifie les différences observées (Morikawa *et al.*, 2016). Ces différences d'internalisation pourraient être liées soit à la localisation différentielle de ces espèces dans l'intestin, soit à des différences d'opsonisation de ces bactéries par des IgA. Nos résultats laissent entrevoir d'autres possibilités pour expliquer ces différences de translocation. *L. murinus* pourrait en effet s'internaliser de façon efficace dans des cellules non phagocytaires, contrairement à *L. taiwanensis*, ce qui favoriserait les événements de translocation de cette bactérie à travers la barrière épithéliale intestinale.

Une étude récente a par ailleurs montré que des *Lactobacillaceae*, et plus particulièrement *L. murinus* et *L. reuteri*, pouvaient se disséminer à partir de la lumière intestinale vers différents organes comme le foie, la rate ou les reins (Udayan *et al.*, 2022). Ces *Lactobacillaceae* pourraient être captés dans la lumière intestinale par les cellules dendritiques sous-épithéliales puis se disséminer dans d'autres organes (Udayan *et al.*, 2022).

Les *Lactobacillaceae* n'ayant pas de systèmes de sécrétion de type 3 décrits à ce jour, nous pouvons supposer que l'internalisation de ces bactéries, comme dans le cas de *S. warneri*, passe par un mécanisme de type « Zipper ». La première étape dans ce processus est l'adhésion de la bactérie avec la cellule hôte. Les *Lactobacillaceae* sont connues pour être capables



d'adhérer aux cellules de l'épithélium intestinal ou à des cellules intestinales en culture in vitro (Greene et Klaenhammer, 1994). La glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase (GAPDH) et l'énolase (ENO), deux enzymes clefs de la glycolyse, peuvent être exprimées à la surface de *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. paracasei* et *L. rhamnosus* où elles jouent un rôle dans l'adhésion en se liant au plasminogène et à la fibronectine (Glenting *et al.*, 2013). Les acides lipoteichoïques de la paroi bactérienne peuvent également servir de facteurs d'adhésion aux Caco2 dans le cas de *L. johnsonii* (Granato *et al.*, 1999) tout comme les protéines CnBP (Collagen-Binding Protein ; Aleljung *et al.*, 1994), MapA (Mucus adhesion-promoting protein ; Miyoshi *et al.*, 2006), ou FbpA (Fibronectin-binding protein ; Buck *et al.*, 2005).

Un certain nombre de *Lactobacillaceae* possèdent également des gènes codant pour des protéines de pili. Chez *L. rhamnosus* la présence de ces pili permet d'ancrer les bactéries dans la couche de mucus (Duar *et al.*, 2017). De façon intéressante, l'adhésion de *Lactobacillaceae* aux cellules intestinales a parfois été associée à une diminution de l'adhésion de bactéries pathogènes à ces mêmes cellules. C'est le cas notamment de *L. johnsonii* NCC533 et de *L. plantarum* 323, adhérant aux cellules Caco2 via le facteur d'élongation Tu (Granato *et al.*, 2004 ; Ramiah *et al.*, 2008) ou la protéine SLAP (S-layer Adhesive Protein) et réduisant l'adhésion d'*Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) (Liu *et al.*, 2011). *L. murinus* est également capable d'adhérer à la surface des cellules Caco2. Malheureusement, aucune protéine impliquée dans cette adhérence n'a été caractérisée (Yuan *et al.*, 2020).

A notre connaissance, il n'y a pas de protéine mis en évidence chez les *Lactobacillaceae* permettant leur internalisation. Cependant les protéines d'adhésions mentionnées précédemment constituent des candidats intéressants. Une comparaison des génomes d'espèces de *Lactobacillaceae* proches phylogénétiquement mais présentant une différence importante dans leur capacité d'internalisation constitue une approche possible pour identifier les protéines impliquées dans l'internalisation de ces bactéries.

## **Conséquences de l'internalisation de bactéries du microbiote sur la physiologie intestinale**

Nous avons pu montrer lors de nos travaux que plusieurs bactéries du microbiote pouvaient s'internaliser dans l'épithélium intestinal. Ces résultats posent maintenant la question de l'impact potentiel de ces événements d'internalisation sur la physiologie intestinale.

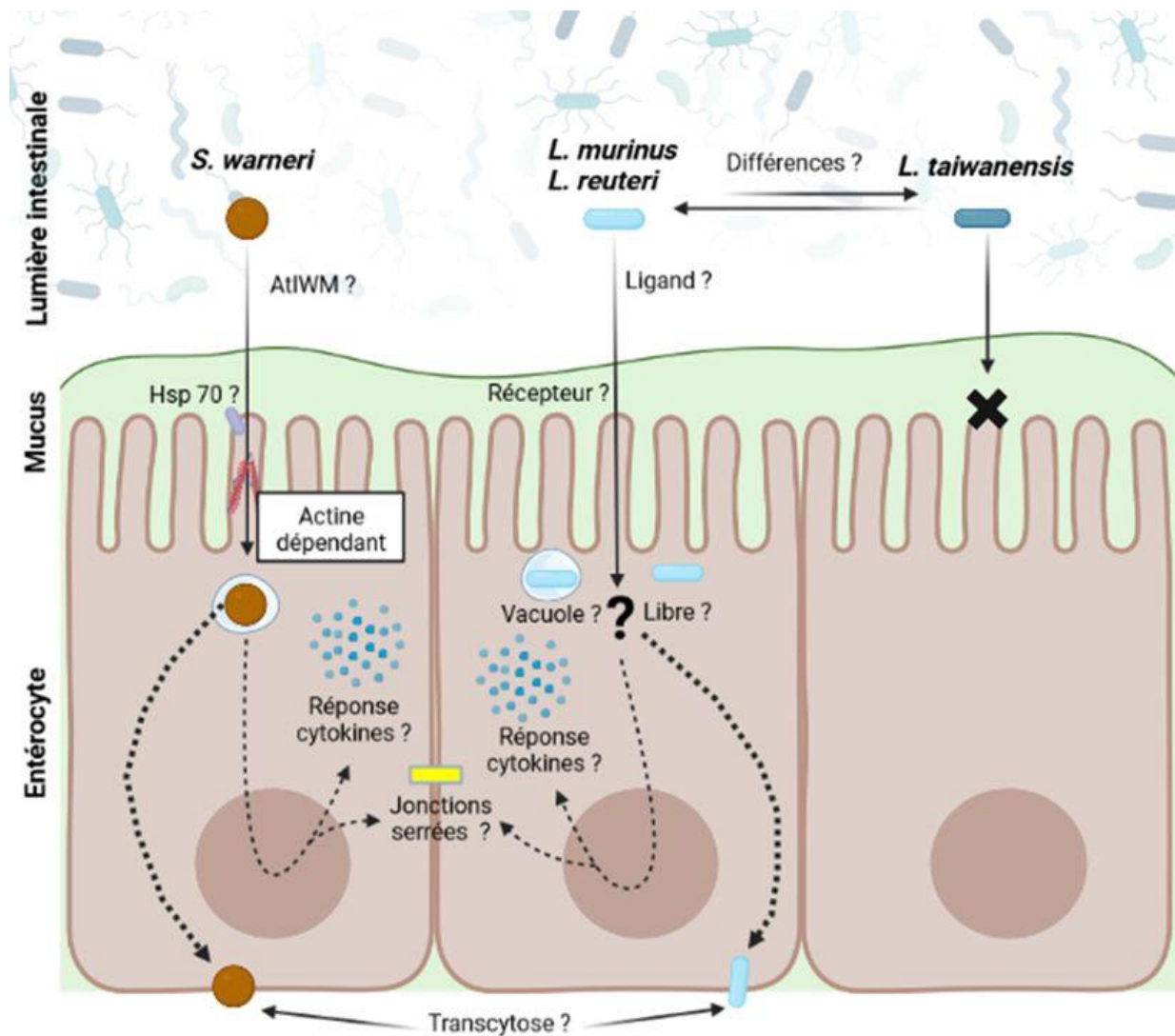
Une approche envisageable serait d'étudier les réponses transcriptomiques des cellules intestinales suite à l'internalisation de *S. warneri* ou de *Lactobacillaceae*. Les taux d'internalisation observés dans nos expériences étant plus faibles que dans le cas des bactéries pathogènes, le nombre de cellules présentant des bactéries intracellulaires reste faible. Afin de pouvoir étudier la réponse des cellules à ces événements d'internalisation, il semble nécessaire de parvenir à trier les cellules contenant des bactéries intracellulaires (par exemple par cytométrie en flux).

Plusieurs études ont utilisé des approches de cytométrie en flux pour étudier l'internalisation de *S. aureus*. Ces approches utilisent soit des bactéries modifiées génétiquement et exprimant un marqueur fluorescent soit un antibiotique lié à un fluorophore (comme la Vancomycine-Bodipy FL<sup>®</sup> ou VBFL) se fixant sur les bactéries d'intérêt (Trouillet *et al.*, 2011). L'utilisation de la cytométrie en flux ne nous donne cependant pas d'indication sur l'« état » des bactéries intracellularisées (vivantes ou mortes, métaboliquement actives ou non), contrairement à un test classique utilisant la gentamicine (Kim *et al.*, 2019).

Ce type d'approche permettrait de déterminer si les cellules ayant internalisé des bactéries non pathogènes du microbiote répondent en produisant des cytokines proinflammatoires (comme dans le cas de pathogènes « classiques ») ou d'autres types de cytokines. Les effets de l'internalisation de ces bactéries sur la perméabilité intestinale seraient également intéressant à observer. Nous avons réalisé des expériences préliminaires d'internalisation dans des systèmes Transwell<sup>®</sup> nous permettant d'évaluer la perméabilité d'un épithélium intestinal reconstitué *in vitro* en mesurant la TEER. Aucun effet de l'internalisation de *S. warneri*, *L. murinus* ou *L. reuteri* n'a pu être mis en évidence sur la perméabilité intestinale. Encore une fois, le faible nombre d'évènements d'internalisation rapporté à l'ensemble de l'épithélium limite grandement la sensibilité de nos mesures. Comme précédemment, un tri des cellules présentant des bactéries intracellulaires pourrait être envisagé pour ensuite quantifier spécifiquement l'expression de protéines impliquées dans la régulation de la perméabilité intestinale comme les protéines de jonctions serrées.

Les *Lactobacillaceae* sont connues pour limiter les augmentations de la perméabilité intestinale associées à des états pathologiques (Zhang *et al.*, 2018). Il serait ainsi intéressant de

déterminer si cet effet est médié par l'internalisation de ces bactéries dans l'épithélium intestinal. D'autre part, les études sur les effets bénéfiques de *Lactobacillaceae* utilisés comme probiotiques sont en partie liés à leur capacité d'établir une interaction directe avec les cellules de l'épithélium intestinal. (Sengupta *et al.*, 2013). Il serait donc également intéressant de savoir si ces effets bénéfiques requièrent l'internalisation de ces bactéries.



(Créé sur BioRender.com)

## Les concepts de bactéries commensales, pathogènes opportunistes et pathobiontes

Les bactéries intestinales sont généralement catégorisées en bactéries « commensales », « symbiotiques » ou « pathogènes ». Même si une telle classification peut apparaître séduisante par sa simplicité et par son caractère manichéen, en opposant les « bonnes » et les « mauvaises » bactéries, celle-ci reste mal adaptée à la complexité des écosystèmes intestinaux. En effet, le caractère « pathogène » de certaines bactéries du microbiote peut varier en fonction des conditions environnementales (et dans notre cas, en fonction des conditions physico-chimiques du milieu intestinal). Ainsi, l'induction de dommages au niveau de l'intestin, par exemple, peut entraîner la prolifération de souches d'*E. coli* (généralement considérée comme non pathogènes) qui expriment des facteurs de virulences associés à des capacité d'invasion et de mobilité Ayres *et al.*, 2012, Le terme « commensal », dont l'utilisation pour désigner les bactéries du microbiote ne causant pas d'effet néfaste à leur hôte est utilisé par l'ensemble de la littérature sur le microbiote, me semble être utilisé à mauvais escient. Le terme « commensal » a été introduit par van Beneden au XIX<sup>ème</sup> siècle, et caractérise un organisme vivant qui tire un avantage de sa relation avec un autre organisme, sans que ce dernier ne souffre ou ne bénéficie de cette relation (Poreau, 2014). En écologie, on distingue classiquement le « commensalisme » du « mutualisme » (où les deux organismes en interaction bénéficient mutuellement de la relation) et du « parasitisme » (où l'un des deux organismes bénéficie de la relation alors que l'autre en souffre) (Zelmer, 1998). Ainsi à titre d'exemple, les *Lactobacillaceae* lactobacilli ou encore *Faecalibacterium prausnitzii* sont couramment dénommées commensales (Zawistowska-Rojek et Tyski, 2018 ; Xu *et al.*, 2020). Pourtant leur effet bénéfique pour l'hôte a été démontré et elles devraient donc être classées comme « mutualistes » si l'on voulait suivre une terminologie plus rigoureuse. De manière générale, toutes bactéries du microbiote intestinal vivant en équilibre avec l'hôte et n'induisant pas de pathologie devraient être considérées comme « mutualistes ». En effet, l'hôte procure un environnement adéquat en termes de pH, d'oxygénation et de nutriments pour la prolifération et la survie de ces bactéries, tandis que ces dernières procurent un avantage à hôte ne serait-ce que par leur seule présence qui contribue à diminuer l'invasion par des pathogènes en induisant une compétition pour l'espace et les ressources.

Le mot « symbiose » est également un terme galvaudé pour décrire certaines des relations bactéries-hôte au sein de l'intestin. La définition originale de ce mot, proposé par de Bary (1879), est la plus fidèle à l'étymologie du mot (composé de « σύν », ensemble et de « βίος », vie) et caractérise la symbiose comme une relation étroite entre deux organismes vivants. Dans cette définition relativement large, le commensalisme, le mutualisme et le

parasitisme sont des formes de symbiose. Le mot a ensuite changé de sens et a longtemps été utilisé pour décrire une relation de longue durée, bénéfique pour les deux partenaires (à la différence du mutualisme qui n'implique pas forcément une interaction de longue durée). La notion de relation obligatoire y a parfois également été associée. Aujourd'hui, certains auteurs retournent vers la définition de de Bary et utilise le mot « symbiose » au sens large (Martin et Schwab, 2012). C'est ce sens que nous utiliserons ici.

Contrairement à la vision classique dichotomique bactéries bénéfique/bactéries néfastes, les interactions hôte-bactéries au sein de l'intestin correspondent à un spectre continu de relations (Rogalski *et al.*, 2021). Ceci a amené à utiliser les notions de « pathogène opportuniste » ou, plus récemment, de « pathobiontes ». Le concept de pathogène opportuniste repose sur le fait que certaines bactéries mutualistes peuvent devenir pathogènes sous certaines conditions. Les Staphylocoques illustrent bien ce concept. *S. epidermidis* est une bactérie du microbiote cutané présente dans une grande majorité de la population humaine (Otto, 2009). Cependant, sa dissémination dans d'autres régions de l'organisme, par exemple lors d'opérations chirurgicales, entraîne la survenu d'un état pathologique. Suivant les auteurs, *S. epidermidis* est donc considéré comme un commensal ou un pathogène. Le terme « pathobionte » est, lui, apparu pour caractériser la bactérie *Helicobacter hepaticus*, une bactérie du microbiote intestinal murin (Mazmanian, 2008). *H. hepaticus* entraîne un état inflammatoire chez les souris immunodéprimées, mais pas chez les souris immunocompétentes (Jochum et Stecher, 2020). Le terme de « pathobionte » se différencie généralement de celui de « pathogène opportuniste » par le fait que le pathobionte devient pathogène, sous certaines conditions, en restant dans sa niche écologique habituelle, alors qu'un pathogène opportuniste devient pathogène lorsqu'il se retrouve dans une niche écologique différente. Un bon exemple de pathobionte est la bactérie *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* est la plus abondantes des entérocoques du tractus gastro-intestinal et l'une des premières bactéries à le coloniser (de Almeida *et al.*, 2018). Elle possède des effets probiotiques et, dans le même temps, a été associée à l'apparition de rectocolites hémorragiques (Krawczyk *et al.*, 2021). *E. faecalis* est particulièrement intéressante dans le cadre de nos travaux car que c'est une bactérie connue pour être capable de s'internaliser dans des cellules non-phagocytaires telles que des entérocytes et les hépatocytes (Nunez *et al.*, 2022). Il semble notamment exister une spécificité liée à la souche quant à la niche de multiplication, certaines souches ne se développant que dans les cellules rénales et non dans les hépatocytes (Nunez *et al.*, 2022). Ainsi, des bactéries telles que les *Lactobacillaceae*, pourtant associées essentiellement à des effets bénéfiques pour la

santé, pourraient dans certains cas causer des bactériémies ou promouvoir des réactions immunitaires (Fine *et al.*, 2020). Considérer toutes les bactéries non plus comme pathogènes ou non pathogènes, mais comme ayant un « potentiel de pathogénicité » pouvant s'exprimer différemment suivant les conditions environnementales semble être un concept plus approprié (Jochum et Stecher, 2020).

Dans le cadre de nos travaux, ces notions sont importantes à prendre en considération. *S. warneri* est en effet considérée comme pathogène opportuniste alors que *L. murinus* et *L. reuteri* sont associées à des effets bénéfiques. Ne plus considérer que l'une est pathogène et que les autres sont non pathogènes, mais que toutes les trois, dans certains contextes, peuvent présenter un caractère pathogène et, dans d'autres, un caractère bénéfique, permet de plus facilement intégrer le rôle potentiel de leur internalisation dans les cellules intestinales.

Dans le cas de *S. warneri*, qui est un pathogène classé comme opportuniste (Kamath *et al.*, 1992 ; Arslan *et al.*, 2011 ; Regecova *et al.*, 2022), la question peut se poser de savoir si nous sommes toujours dans une condition de bactéries « commensales » ou de « pathogènes » lorsque celles-ci s'internalisent dans nos cellules. Le suivi de la survie de ces bactéries pendant 48 h après l'internalisation indique qu'il n'y a pas de prolifération des bactéries intracellulaires, comme cela peut être le cas chez des pathogènes comme *M. tuberculosis* ou *L. monocytogenes*. Nous observons au contraire une diminution du nombre de bactéries au cours du temps. De même, *S. warneri* ne survit pas au sein des macrophages et est rapidement éliminée après sa phagocytose. Ces éléments suggèrent que *S. warneri*, même si elle s'internalise, n'adopte pas un comportement « pathogénique ». Il reste maintenant à déterminer si l'ensemble des *S. warneri* est éliminé après quelques jours dans des cellules non phagocytaires, ou si certaines bactéries peuvent persister dans un état de « dormance » (métaboliquement inactives) (Peyrusson *et al.*, 2020). La majorité des cellules intestinales ont une durée de vie de 3 à 5 jours. Une capacité de persistance de longue durée des bactéries dans des cellules hôtes ne pourrait avoir d'intérêt que dans certains types cellulaires à longue durée de vie, comme les cellules souches des cryptes intestinales par exemple.

La notion de « potentiel de pathogénicité » variable peut également s'appliquer à la bactérie *E. coli*. Il est en effet intéressant de noter que la bactérie *E. coli* K-12 SK3842 est capable de s'internaliser dans les cellules intestinales (Koli *et al.*, 2011). Cette souche dérive de la souche *E. coli* K-12, considérée comme non pathogène et non invasive, par mutation du

gène codant pour H $\alpha$ , une protéine de type histone. Aucun autre trait de pathogénicité n'a été observé pour cette souche (Koli *et al.*, 2011). Cette étude met donc en avant la possibilité que, sous des conditions particulières, une souche considérée comme strictement extracellulaire puisse devenir intracellulaire, sans pour autant avoir d'effets néfastes sur la physiologie intestinale.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé la souche *E. coli* K12 comme « contrôle négatif » de la capacité d'internalisation. Cependant, nous avons toujours observé un faible niveau (non nul) d'internalisation avec cette bactérie. La bactérie *L. taiwanensis* semble, elle, avoir des taux d'internalisation encore plus faibles que ceux d'*E. coli*. Ainsi, il semble difficile de pouvoir définir un seuil au-delà duquel nous pouvons considérer qu'une bactérie s'internalise ou pas, puisque même *E. coli* K12 présente une efficacité d'internalisation non nulle. Comme dans le cas du « potentiel de pathogénicité », il existe probablement un gradient continu de « capacité d'internalisation » des bactéries du microbiote, cette capacité pouvant varier en fonction des conditions pour une espèce bactérienne donnée.

## **Les bactéries non-pathogènes : un rôle dans l'évolution de la cellule eucaryote ?**

La capacité des bactéries non pathogènes à s'internaliser dans les cellules humaines est un concept nouveau qui ouvre la voie à une nouvelle vision des interactions entre microbiote et organismes hôtes. Un certain nombre d'organisme pathogène intracellulaire obligatoire, telles que les bactéries du genre *Rickettsia*, ont co-évolué avec leur organisme hôte (Voss et Rahman, 2021) et ont considérablement réduit leur génome au cours de cette coévolution pour s'adapter à une vie exclusivement intracellulaire. Les organites telles que les mitochondries et les chloroplastes sont considérés comme provenant de ce type de coévolution (théorie endosymbiotique) (Roger *et al.*, 2017). L'idée que des bactéries non pathogènes puissent s'internaliser peut amener à repenser cette coévolution comme résultant de symbioses prolongées au cours de l'évolution entre des bactéries non pathogènes du microbiote et les cellules de l'hôte.

## Importance du concept d'internalisation de bactéries non pathogènes

Si nous admettons le fait que des bactéries s'internalisent sans présenter de pathogénicité pour l'hôte, la question peut se poser de l'intérêt d'étudier ce phénomène en termes de santé publique. Au cours de nos travaux, nous avons pu bénéficier d'échantillons provenant d'une cohorte de volontaires sains. Une perspective serait maintenant d'élargir notre étude de l'abondance de *S. warneri* ou de *L. murins/reuteri* à des groupes variés d'individus, et plus particulièrement chez certains patients atteints de pathologies intestinales. La mise en évidence de corrélations entre l'abondance de ces bactéries présentant une capacité d'internalisation et certains symptômes cliniques pourrait nous permettre de définir ces espèces comme des marqueurs diagnostiques ou pronostiques.

L'idée que des bactéries symbiotiques puissent être hébergées dans nos cellules intestinales peut également amener à penser que ces bactéries seront en partie protégées lors de l'utilisation d'antibiotiques. Il est connu que l'exposition de bactéries à des concentrations d'antibiotiques sub-létales augmente le risque de développement de résistances (Roberts *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que parmi les bactéries présentant le plus fréquemment des mécanismes de résistance, on trouve de nombreuses espèces ayant la capacité de s'internaliser dans des cellules non phagocytaires (*S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Camylobacter jejuni*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia*, etc. Davies et Davies, 2010). Dans le cas de bactéries non pathogènes, nous pourrions observer une acquisition de résistance à des antibiotiques puis un transfert de cette capacité de résistance vers des bactéries pathogènes également présentes dans le microbiote intestinal. De plus, ces espèces intracellularisées et résistantes auront un avantage sélectif lors de la recolonisation de l'intestin suite à l'arrêt de la prise d'antibiotiques. Cela pourrait amener à une dysbiose et entraîner un risque accru de survenu de pathologies.

Du point de vue des « applications thérapeutiques » potentielles, l'identification de bactérie non-pathogènes capables de s'internaliser laisse entrevoir la possibilité de les utiliser comme vecteurs pouvant délivrer des molécules d'intérêt directement à l'intérieur des cellules humaines. Il existe déjà des exemples d'utilisation de bactéries pathogènes, comme *Salmonella*



ou *Listeria* (modifiées pour perdre leur caractère pathogénique) dans le cas de traitement anticancéreux (Zhou *et al.*, 2018). L'utilisation de probiotiques naturellement non pathogène mais capables de s'internaliser pourrait présenter un potentiel intéressant dans ce cas de figure.

Les derniers criblages de bactéries du microbiote pouvant s'internaliser intracellulaires réalisés au laboratoire ont identifié une nouvelle espèce candidate, *Dubosiella*. *Dubosiella* est une bactérie de type Gram positif, anaérobie et non sporulée décrite récemment, dont la seule représentante connue actuellement est *D. newyorkensis* (Cox *et al.*, 2017). *Dubosiella* est une bactérie productrice de SCFA (Ye *et al.*, 2021). Son abondance est corrélée négativement à l'expression des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  et positivement à l'expression de l'IL-10, dans le contexte d'une colite induite par du DSS (Dextran Sodium Sulfate) (Wan *et al.*, 2021). Nous devons maintenant mettre au point les conditions de culture de cette espèce bactérienne pour pouvoir confirmer sa capacité d'internalisation dans nos différents modèles.

En parallèle de nos expériences de criblage, nous pouvons également envisager de tester les capacités d'internalisation de bactéries « bénéfiques » déjà bien caractérisées, comme *Akkermansia muciniphila*, dont la capacité à dégrader la couche de mucus la prédispose à être en contact direct avec les cellules intestinales en conditions physiologiques (Liu *et al.*, 2022).

La pauvreté de la littérature sur l'existence de bactérie résidentes du microbiote intestinal capables de s'internaliser, sans avoir d'effet pathogène, peut s'expliquer par le fait que la découverte de l'internalisation de bactéries est souvent le résultat de l'étude d'une pathologie et de la recherche du (des) pathogène(s) associé(s). La recherche de bactéries intracellulaires chez des individus sains est donc un champ d'exploration à inclure dans de futur programme de recherches pour caractériser et mieux comprendre ce nouveau type d'interaction entre bactéries non pathogène du microbiote et cellules hôte.

## Références bibliographiques

- Adak, A., Khan, M.R., 2019. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Aggarwal, V., Sunder, S., Verma, S.R., 2022. Disease-associated dysbiosis and potential therapeutic role of *Akkermansia muciniphila*, a mucus degrading bacteria of gut microbiome. *Folia Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s12223-022-00973-6>
- Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J.-P., Molle, V., 2021. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins* 13, 677. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>
- Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R.J., Henderson, B., Brock, J.H., Nair, S.P., 2001. *Staphylococcus aureus* Fibronectin Binding Proteins Are Essential for Internalization by Osteoblasts but Do Not Account for Differences in Intracellular Levels of Bacteria. *Infect Immun* 69, 2872–2877. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2872-2877.2001>
- Ait Seddik, H., Bendali, F., Cudennec, B., Drider, D., 2017. Anti-pathogenic and probiotic attributes of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* strains isolated from feces of Algerian infants and adults. *Research in Microbiology* 168, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.12.003>
- Al Kindi, A., Alkahtani, A.M., Nalubega, M., El-Chami, C., O'Neill, C., Arkwright, P.D., Pennock, J.L., 2019. *Staphylococcus aureus* Internalized by Skin Keratinocytes Evade Antibiotic Killing. *Front. Microbiol.* 10, 2242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02242>
- Aleljung, P., Shen, W., Rozalska, B., Hellman, U., Ljungh, A., Wadström, T., 1994. Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr Microbiol* 28, 231–236. <https://doi.org/10.1007/BF01575966>
- Alipoor, S.D., Mirsaeidi, M., 2021. Inborn Errors in the LRR Domain of Nod2 and Their Potential Consequences on the Function of the Receptor. *Cells* 10, 2031. <https://doi.org/10.3390/cells10082031>
- Allignet, J., England, P., Old, I., El Solh, N., 2002. Several regions of the repeat domain of the *Staphylococcus caprae* autolysin, AtlC, are involved in fibronectin binding. *FEMS Microbiol Lett* 213, 193–197. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11305.x>
- Almeida, A., Nayfach, S., Boland, M., Strozzi, F., Beracochea, M., Shi, Z.J., Pollard, K.S., Sakharova, E., Parks, D.H., Hugenholtz, P., Segata, N., Kyrpides, N.C., Finn, R.D., 2021. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 39, 105–114. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0603-3>
- Antunes, F., Andrade, F., Araújo, F., Ferreira, D., Sarmiento, B., 2013. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 83, 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.003>
- Arbolea, S., Salazar, N., Solís, G., Fernández, N., Hernández-Barranco, A.M., Cuesta, I., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., 2013. Assessment of intestinal microbiota modulation ability of *Bifidobacterium* strains in in vitro fecal batch cultures from preterm neonates. *Anaerobe* 19, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.001>

- Arslan, F., Saltoglu, N., Mete, B., Mert, A., 2011. Recurrent *Staphylococcus warnerii* prosthetic valve endocarditis: A case report and review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 10, 14. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-14>
- Ashammakhi, N., Nasiri, R., Roberto De Barros, N., Tebon, P., Thakor, J., Goudie, M., Shamloo, A., Martin, M.G., Khademhosseni, A., 2020. Gut-on-a-chip: Current Progress and Future Opportunities. *Biomaterials* 255, 120196. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120196>
- Ashraf, S., Cheng, J., Zhao, X., 2017. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. *Sci Rep* 7, 40608. <https://doi.org/10.1038/srep40608>
- Askarian, F., Ajayi, C., Hanssen, A.-M., van Sorge, N.M., Pettersen, I., Diep, D.B., Sollid, J.U.E., Johannessen, M., 2016. The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells. *Sci Rep* 6, 22134. <https://doi.org/10.1038/srep22134>
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L., 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 280, G922–G929. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922>
- Ayres, J.S., Trinidad, N.J., Vance, R.E., 2012. Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. *Nat Med* 18, 799–806. <https://doi.org/10.1038/nm.2729>
- Babamale, A.O., Chen, S.-T., 2021. Nod-like Receptors: Critical Intracellular Sensors for Host Protection and Cell Death in Microbial and Parasitic Infections. *IJMS* 22, 11398. <https://doi.org/10.3390/ijms222111398>
- Bach Knudsen, K., Lærke, H., Hedemann, M., Nielsen, T., Ingerslev, A., Gundelund Nielsen, D., Theil, P., Purup, S., Hald, S., Schioldan, A., Marco, M., Gregersen, S., Hermansen, K., 2018. Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients* 10, 1499. <https://doi.org/10.3390/nu10101499>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M.T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y.S., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., Yin, Y., Bergman, S., Xu, X., Madsen, L., Kristiansen, K., Dahlgren, J., Wang, J., 2015. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe* 17, 690–703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Barilleau, E., Védrine, M., Koczerka, M., Burlaud-Gaillard, J., Kempf, F., Grépinet, O., Virlogeux-Payant, I., Velge, P., Wiedemann, A., 2021. Investigation of the invasion mechanism mediated by the outer membrane protein PagN of *Salmonella* Typhimurium. *BMC Microbiol* 21, 153. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02187-1>
- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G., 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 27, 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Berry, K.A., Verhoef, M.T.A., Leonard, A.C., Cox, G., 2022. *Staphylococcus aureus* adhesion to the host. *Annals NY Academy of Science* 1515, 75–96. <https://doi.org/10.1111/nyas.14807>
- Bisi, S., Disanza, A., Malinverno, C., Frittoli, E., Palamidessi, A., Scita, G., 2013. Membrane and actin dynamics interplay at lamellipodia leading edge. *Current Opinion in Cell Biology* 25, 565–573. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.04.001>

- Blair, J.M.A., Richmond, G.E., Bailey, A.M., Ivens, A., Piddock, L.J.V., 2013. Choice of Bacterial Growth Medium Alters the Transcriptome and Phenotype of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS ONE* 8, e63912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063912>
- Bogut, A., Niedźwiadek, J., Kozioł-Montewka, M., Strzelec-Nowak, D., Blacha, J., Mazurkiewicz, T., Marczyński, W., Plewik, D., 2014. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus warneri* small-colony variants associated with prosthetic-joint infections. *Journal of Medical Microbiology* 63, 176–185. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.066068-0>
- Bohl, L.P., Isaac, P., Bresler, M.L., Orellano, M.S., Correa, S.G., Tolosa de Talamoni, N.G., Porporatto, C., 2021. Interaction between bovine mammary epithelial cells and planktonic or biofilm *Staphylococcus aureus*: The bacterial lifestyle determines its internalization ability and the pathogen recognition. *Microbial Pathogenesis* 152, 104604. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104604>
- BoseDasgupta, S., Pieters, J., 2018. Macrophage-microbe interaction: lessons learned from the pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunopathol* 40, 577–591. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0710-0>
- Brisse, M., Ly, H., 2019. Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5. *Front Immunol* 10, 1586. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01586>
- Bron, P.A., Kleerebezem, M., Brummer, R.-J., Cani, P.D., Mercenier, A., MacDonald, T.T., Garcia-Ródenas, C.L., Wells, J.M., 2017. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br J Nutr* 117, 93–107. <https://doi.org/10.1017/S0007114516004037>
- Brückner, R., 1997. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosum*. *FEMS Microbiology Letters* 151, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10387.x>
- Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T., Klaenhammer, T.R., 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 71, 8344–8351. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005>
- Bukowski, M., Wladyka, B., Dubin, G., 2010. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 2, 1148–1165. <https://doi.org/10.3390/toxins2051148>
- Bur, S., Preissner, K.T., Herrmann, M., Bischoff, M., 2013. The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Promotes Bacterial Internalization by Keratinocytes Independent of Fibronectin-Binding Proteins. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 2004–2012. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.87>
- Cani, P.D., 2017. Gut microbiota — at the intersection of everything? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 321–322. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.54>
- Capaldo, C.T., Powell, D.N., Kalman, D., 2017. Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. *J Mol Med* 95, 927–934. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1557-x>
- Case, E.D.R., Samuel, J.E., 2016. Contrasting Lifestyles Within the Host Cell. *Microbiol Spectr* 4, 4.1.11. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0014-2015>
- Cauteren, D.V., Le Strat Y., Sommen, C., Bruyand, M., Tourdjman, M., Jourdan Da Silva, N., Couturier, E., Fournet, N., de Valk, H., Desenclos, J.C., 2018. Estimation de la morbidité et de la mortalité liées aux infections d'origine alimentaire en France métropolitaine, 2008-2013. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 1, 2-10.

- Chang, C., Jensen, L.E., Hurley, J.H., 2021. Autophagosome biogenesis comes out of the black box. *Nat Cell Biol* 23, 450–456. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00669-y>
- Chee, W.J.Y., Chew, S.Y., Than, L.T.L., 2020. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Fact* 19, 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4>
- Cimiotti, J.P., Haas, J.P., Della-Latta, P., Wu, F., Saiman, L., Larson, E.L., 2007. Prevalence and Clinical Relevance of *Staphylococcus warneri* in the Neonatal Intensive Care Unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 28, 326–330. <https://doi.org/10.1086/511998>
- Claes, J., Liesenborghs, L., Peetermans, M., Veloso, T.R., Missiakas, D., Schneewind, O., Mancini, S., Entenza, J.M., Hoylaerts, M.F., Heying, R., Verhamme, P., Vanassche, T., 2017. Clumping factor A, von Willebrand factor-binding protein and von Willebrand factor anchor *Staphylococcus aureus* to the vessel wall. *J Thromb Haemost* 15, 1009–1019. <https://doi.org/10.1111/jth.13653>
- Co, J.Y., Margalef-Català, M., Li, X., Mah, A.T., Kuo, C.J., Monack, D.M., Amieva, M.R., 2019. Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions. *Cell Rep* 26, 2509–2520.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.108>
- Cockram, T.O.J., Dundee, J.M., Popescu, A.S., Brown, G.C., 2021. The Phagocytic Code Regulating Phagocytosis of Mammalian Cells. *Front Immunol* 12, 629979. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.629979>
- Cong, J., Zhou, P., Zhang, R., 2022. Intestinal Microbiota-Derived Short Chain Fatty Acids in Host Health and Disease. *Nutrients* 14, 1977. <https://doi.org/10.3390/nu14091977>
- Costea, P.I., Hildebrand, F., Arumugam, M., Bäckhed, F., Blaser, M.J., Bushman, F.D., de Vos, W.M., Ehrlich, S.D., Fraser, C.M., Hattori, M., Huttenhower, C., Jeffery, I.B., Knights, D., Lewis, J.D., Ley, R.E., Ochman, H., O'Toole, P.W., Quince, C., Relman, D.A., Shanahan, F., Sunagawa, S., Wang, J., Weinstock, G.M., Wu, G.D., Zeller, G., Zhao, L., Raes, J., Knight, R., Bork, P., 2018. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol* 3, 8–16. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0072-8>
- Cox, L.M., Sohn, J., Tyrrell, K.L., Citron, D.M., Lawson, P.A., Patel, N.B., Iizumi, T., Perez-Perez, G.I., Goldstein, E.J.C., Blaser, M.J., 2017. Description of two novel members of the family Erysipelotrichaceae: *Ileibacterium valens* gen. nov., sp. nov. and *Dubosiella newyorkensis*, gen. nov., sp. nov., from the murine intestine, and emendation to the description of *Faecalibaculum rodentium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 1247–1254. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001793>
- Coyne, M.J., Comstock, L.E., 2019. Type VI Secretion Systems and the Gut Microbiota. *Microbiol Spectr* 7, 7.2.03. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0009-2018>
- Csukovich, G., Pratscher, B., Burgener, I.A., 2022. The World of Organoids: Gastrointestinal Disease Modelling in the Age of 3R and One Health with Specific Relevance to Dogs and Cats. *Animals (Basel)* 12, 2461. <https://doi.org/10.3390/ani12182461>
- da Silva, C.V., Cruz, L., Araújo, N. da S., Angeloni, M.B., Fonseca, B.B., Gomes, A. de O., Carvalho, F. dos R., Gonçalves, A.L.R., Barbosa, B. de F., 2012. A glance at *Listeria* and *Salmonella* cell invasion: Different strategies to promote host actin polymerization. *International Journal of Medical Microbiology* 302, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.05.003>

- da Silva, R.A.G., Tay, W.H., Ho, F.K., Tanoto, F.R., Chong, K.K.L., Choo, P.Y., Ludwig, A., Kline, K.A., 2022. Enterococcus faecalis alters endo-lysosomal trafficking to replicate and persist within mammalian cells. *PLoS Pathog* 18, e1010434. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010434>
- Dabija-Wolter, G., Cimpan, M.-R., Costea, D.E., Johannessen, A.C., Sørnes, S., Neppelberg, E., Al-Haroni, M., Skaug, N., Bakken, V., 2009. *Fusobacterium nucleatum* Enters Normal Human Oral Fibroblasts In Vitro. *Journal of Periodontology* 80, 1174–1183. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090051>
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S., Berenjian, A., Ghasemi, Y., 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* 8, 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- de Almeida, C.V., Taddei, A., Amedei, A., 2018. The controversial role of Enterococcus faecalis in colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol* 11, 1756284818783606. <https://doi.org/10.1177/1756284818783606>
- De Bary, 1879. *Revue internationale des sciences*. O. Doin, Paris.
- de Muinck, E.J., Trosvik, P., 2018. Individuality and convergence of the infant gut microbiota during the first year of life. *Nat Commun* 9, 2233. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04641-7>
- Deacy, A.M., Gan, S.K.-E., Derrick, J.P., 2021. Superantigen Recognition and Interactions: Functions, Mechanisms and Applications. *Front. Immunol.* 12, 731845. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.731845>
- Devriese, S., Van den Bossche, L., Van Welden, S., Holvoet, T., Pinheiro, I., Hindryckx, P., De Vos, M., Laukens, D., 2017. T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. *Histochem Cell Biol* 148, 85–93. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1539-7>
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Drolia, R., Tenguria, S., Durkes, A.C., Turner, J.R., Bhunia, A.K., 2018. Listeria Adhesion Protein Induces Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction for Bacterial Translocation. *Cell Host & Microbe* 23, 470-484.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.004>
- Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H.Y., Wang, R.-F., 2022. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front. Immunol.* 13, 812774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>
- Duar, R.M., Lin, X.B., Zheng, J., Martino, M.E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M.E., Leulier, F., Gänzle, M., Walter, J., 2017. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews* 41, S27–S48. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux030>
- Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R., Bohach, G.A., 1999. Fibronectin Binding Protein and Host Cell Tyrosine Kinase Are Required for Internalization of *Staphylococcus aureus* by Epithelial Cells. *Infect Immun* 67, 4673–4678.

- Edwards, A.M., Grossman, T.J., Rudney, J.D., 2006. *Fusobacterium nucleatum* Transports Noninvasive *Streptococcus cristatus* into Human Epithelial Cells. *INFECT. IMMUN.* 74, 9.
- Engle, M.J., Goetz, G.S., Alpers, D.H., 1998. Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J. Cell. Physiol.* 174, 362–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199803\)174:3<362::AID-JCP10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199803)174:3<362::AID-JCP10>3.0.CO;2-B)
- Fallingborg, J., Christensen, L.A., Ingeman-Nielsen, M., Jacobsen, B.A., Abildgaard, K., Rasmussen, H.H., Rasmussen, S.N., 2007. Gastrointestinal pH and transit times in healthy subjects with ileostomy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 4, 247–253. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.1990.tb00469.x>
- Fardini, Y., Wang, X., Témoïn, S., Nithianantham, S., Lee, D., Shoham, M., Han, Y.W., 2011. *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity: VE-cadherin is a novel receptor for *F. nucleatum*. *Molecular Microbiology* 82, 1468–1480. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07905.x>
- Fine, R.L., Mubiru, D.L., Kriegel, M.A., 2020. Friend or foe? *Lactobacillus* in the context of autoimmune disease, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 29–56. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2020.02.002>
- Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T., 1977. One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice<sup>23</sup>. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 59, 221–226. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.1.221>
- Fox, P.G., Schiavetti, F., Rappuoli, R., McLoughlin, R.M., Bagnoli, F., 2021. Staphylococcal Protein A Induces Leukocyte Necrosis by Complexing with Human Immunoglobulins. *mBio* 12, e00899-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00899-21>
- Gagnon, M., Zihler Berner, A., Chervet, N., Chassard, C., Lacroix, C., 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *Journal of Microbiological Methods* 94, 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>
- Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G., Portnoy, D.A., 2000. Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 68, 999–1003. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.999-1003.2000>
- Gilbert, S.F., Sapp, J., Tauber, A.I., 2012. A Symbiotic View of Life: We Have Never Been Individuals. *The Quarterly Review of Biology* 87, 325–341. <https://doi.org/10.1086/668166>
- Glenting, J., Beck, H.C., Vrang, A., Riemann, H., Ravn, P., Hansen, A.M., Antonsson, M., Ahrné, S., Israelsen, H., Madsen, S., 2013. Anchorless surface associated glycolytic enzymes from *Lactobacillus plantarum* 299v bind to epithelial cells and extracellular matrix proteins. *Microbiological Research* 168, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.01.003>
- González, S., Fernández-Navarro, T., Arbolea, S., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salazar, N., Gueimonde, M., 2019. Fermented Dairy Foods: Impact on Intestinal Microbiota and Health-Linked Biomarkers. *Front Microbiol* 10, 1046. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01046>
- Gou, H.-Z., Zhang, Y.-L., Ren, L.-F., Li, Z.-J., Zhang, L., 2022. How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? *Front. Microbiol.* 13, 929346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.929346>
- Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M., Corthésy-Theulaz, I.E., 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus*

- johnsonii NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 72, 2160–2169. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2160-2169.2004>
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., Brassart, D., 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 65, 1071–1077. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1071-1077.1999>
- Greene, J.D., Klaenhammer, T.R., 1994. Factors Involved in Adherence of Lactobacilli to Human Caco-2 Cellst 60, 8.
- Hänisch, J., Kölm, R., Wozniczka, M., Bumann, D., Rottner, K., Stradal, T.E.B., 2011. Activation of a RhoA/Myosin II-Dependent but Arp2/3 Complex-Independent Pathway Facilitates Salmonella Invasion. *Cell Host & Microbe* 9, 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.009>
- Hara, A., Hibi, T., Yoshioka, M., Toda, K., Watanabe, N., Hayashi, A., Iwao, Y., Saito, H., Watanabe, T., Tsuchiya, M., 1993. Changes of proliferative activity and phenotypes in spontaneous differentiation of a colon cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 84, 625–632. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1993.tb02022.x>
- He, W., Wang, M.-L., Jiang, H.-Q., Stepan, C.M., Shin, M.E., Thurnheer, M.C., Cebra, J.J., Lazar, M.A., Wu, G.D., 2003. Bacterial colonization leads to the colonic secretion of RELM $\beta$ /FIZZ2, a novel goblet cell-specific protein. *Gastroenterology* 125, 1388–1397. <https://doi.org/10.1016/j.gastro.2003.07.009>
- Hell, W., Meyer, H.G., Gatermann, S.G., 1998. Cloning of aas, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol Microbiol* 29, 871–881. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00983.x>
- Hemme, D., Raibaud, P., Ducluzeau, R., Galpin, J.V., Sicard, P., Van Heijenoort, J., 1980. ["*Lactobacillus murinus*" n. sp., a new species of the autochtoneous dominant flora of the digestive tract of rat and mouse (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris)* 131, 297–308.
- Hertli, S., Zimmermann, P., 2022. Molecular interactions between the intestinal microbiota and the host. *Molecular Microbiology* 117, 1297–1307. <https://doi.org/10.1111/mmi.14905>
- Hira, V., Kornelisse, R.F., Sluijter, M., Kamerbeek, A., Goessens, W.H.F., de Groot, R., Hermans, P.W.M., 2013. Colonization Dynamics of Antibiotic-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in Neonates. *J Clin Microbiol* 51, 595–597. <https://doi.org/10.1128/JCM.02935-12>
- Hirschhausen, N., Schlesier, T., Peters, G., Heilmann, C., 2012. Characterization of the Modular Design of the Autolysin/Adhesin Aaa from *Staphylococcus Aureus*. *PLoS ONE* 7, e40353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040353>
- Hirschhausen, N., Schlesier, T., Schmidt, M.A., Götz, F., Peters, G., Heilmann, C., 2010. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor: Atl-mediated staphylococcal internalization. *Cellular Microbiology* 12, 1746–1764. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01506.x>
- Hsu, C.-C., Okumura, R., Takeda, K., 2017. Human LYPD8 protein inhibits motility of flagellated bacteria. *Inflamm Regen* 37, 23. <https://doi.org/10.1186/s41232-017-0056-3>
- Hsu, P.P., Sabatini, D.M., 2008. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* 134, 703–707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>



- Hu, Y., 2012. Bacterial flora concurrent with *Helicobacter pylori* in the stomach of patients with upper gastrointestinal diseases. *WJG* 18, 1257. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i11.1257>
- Huang, F., Teng, K., Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Ma, C., Zhang, J., Zhong, J., 2021. Bacteriocins: Potential for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2021/5518825>
- Hume, P.J., Singh, V., Davidson, A.C., Koronakis, V., 2017. Swiss Army Pathogen: The Salmonella Entry Toolkit. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 348. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00348>
- Incani, R.N., Hernández, M., Cortez, J., González, M.E., Dorel Salazar, Y., 2010. Staphylococcus warneri meningitis in a patient with Strongyloides stercoralis hyperinfection and lymphoma: first report of a case. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 52, 169–170. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000300011>
- Isani, M., Bell, B.A., Delaplain, P.T., Bowling, J.D., Golden, J.M., Elizee, M., Illingworth, L., Wang, J., Gayer, C.P., Grishin, A.V., Ford, H.R., 2018. Lactobacillus murinus HF12 colonizes neonatal gut and protects rats from necrotizing enterocolitis. *PLoS ONE* 13, e0196710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196710>
- Jay, P., 2021. Tuft cells: sentinels of the intestinal mucosa. *Comptes Rendus Biologies* 344, 3, 263–273. <https://doi.org/10.5802/crbiol.60>
- Jochum, L., Stecher, B., 2020. Label or Concept – What Is a Pathobiont? *Trends in Microbiology* 28, 789–792. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.011>
- Josse, J., Laurent, F., Diot, A., 2017. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Front. Microbiol.* 8, 2433. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02433>
- Kalia, V.C., Gong, C., Shanmugam, R., Lin, H., Zhang, L., Lee, J.-K., 2022. The Emerging Biotherapeutic Agent: Akkermansia. *Indian J Microbiol* 62, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12088-021-00993-9>
- Kalischuk, L.D., Inglis, G.D., Buret, A.G., 2009. Campylobacter jejuni induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathog* 1, 2. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-2>
- Kamath, U., Singer, C., Isenberg, H.D., 1992. Clinical significance of Staphylococcus warneri bacteremia. *J Clin Microbiol* 30, 261–264. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.2.261-264.1992>
- Kammoun, H., Kim, M., Hafner, L., Gaillard, J., Disson, O., Lecuit, M., 2022. Listeriosis, a model infection to study host-pathogen interactions *in vivo*. *Curr Opin Microbiol* 66, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.11.015>
- Kamphuis, J.B.J., Mercier-Bonin, M., Eutamène, H., Theodorou, V., 2017. Mucus organisation is shaped by colonic content; a new view. *Sci Rep* 7, 8527. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08938-3>
- Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M., Doi, K., 1996. Histochemical, Lectin-Histochemical and Morphometrical Characteristics of Intestinal Goblet Cells of Germfree and Conventional Mice. *Experimental Animals* 45, 155–160. <https://doi.org/10.1538/expanim.45.155>
- Kang, S., Dai, A., Wang, H., Ding, P.-H., 2022. Interaction Between Autophagy and Porphyromonas gingivalis-Induced Inflammation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 892610. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.892610>

- Kayama, H., Okumura, R., Takeda, K., 2020. Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 23–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-070119-115104>
- Khalil, H., Williams, R.J., Stenbeck, G., Henderson, B., Meghji, S., Nair, S.P., 2007. Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes and Infection* 9, 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.002>
- Khan, I., Steeg, P.S., 2021. Endocytosis: a pivotal pathway for regulating metastasis. *Br J Cancer* 124, 66–75. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01179-8>
- Kim, J.-H., Chaurasia, A.K., Batool, N., Ko, K.S., Kim, K.K., 2019. Alternative Enzyme Protection Assay To Overcome the Drawbacks of the Gentamicin Protection Assay for Measuring Entry and Intracellular Survival of *Staphylococci*. *Infect Immun* 87, e00119-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00119-19>
- Kobayashi, N., Takahashi, D., Takano, S., Kimura, S., Hase, K., 2019. The Roles of Peyer’s Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 10, 2345. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02345>
- Koli, P., Sudan, S., Fitzgerald, D., Adhya, S., Kar, S., 2011. Conversion of Commensal *Escherichia coli* K-12 to an Invasive Form via Expression of a Mutant Histone-Like Protein. *mBio* 2, e00182-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00182-11>
- Kosecka-Strojek, M., Buda, A., Międzobrodzki, J., 2018. Staphylococcal Ecology and Epidemiology, in: *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*. Elsevier, pp. 11–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00002-9>
- Kozłowski, M.T., Crook, C.J., Ku, H.T., 2021. Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol* 4, 1387. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02910-8>
- Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., Michalik, M., 2021. The Many Faces of *Enterococcus* spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms* 9, 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
- Kurokawa, K., Hayakawa, Y., Koike, K., 2020. Plasticity of Intestinal Epithelium: Stem Cell Niches and Regulatory Signals. *IJMS* 22, 357. <https://doi.org/10.3390/ijms22010357>
- Kuvhenguhwa, M.S., Belgrave, K.O., Shah, S.U., Bayer, A.S., Miller, L.G., 2017. A Case of Early Prosthetic Valve Endocarditis Caused by *Staphylococcus warneri* in a Patient Presenting With Congestive Heart Failure. *Cardiol Res* 8, 236–240. <https://doi.org/10.14740/cr588w>
- Lai, Y.H., D’Souza, M.J., 2008. Microparticle transport in the human intestinal M cell model. *Journal of Drug Targeting* 16, 36–42. <https://doi.org/10.1080/10611860701639848>
- Latomanski, E.A., Newton, H.J., 2019. Taming the Triskelion: Bacterial Manipulation of Clathrin. *Microbiol Mol Biol Rev* 83, e00058-18. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00058-18>
- Lecároz, C., Campanero, M.A., Gamazo, C., Blanco-Prieto, M.J., 2006. Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method. *J Antimicrob Chemother* 58, 557–563. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl258>
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B., Cossart, P., 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* 18, 3956–3963. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.14.3956>

- Lee, S.J., Baek, Y.J., Kim, J.N., Lee, K.H., Lee, E.H., Yeom, J.S., Choi, J.Y., Ku, N.S., Ahn, J.Y., Kim, J.H., Jeong, S.J., 2022. Increasing Fusobacterium infections with *Fusobacterium varium*, an emerging pathogen. *PLoS One* 17, e0266610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266610>
- León Machado, J.A., Steimle, V., 2021. The MHC Class II Transactivator CIITA: Not (Quite) the Odd-One-Out Anymore among NLR Proteins. *Int J Mol Sci* 22, 1074. <https://doi.org/10.3390/ijms22031074>
- Lhocine, N., Arena, E.T., Bomme, P., Ubelmann, F., Prévost, M.-C., Robine, S., Sansonetti, P.J., 2015. Apical Invasion of Intestinal Epithelial Cells by *Salmonella typhimurium* Requires Villin to Remodel the Brush Border Actin Cytoskeleton. *Cell Host Microbe* 17, 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.12.003>
- Li, D., Wu, M., 2021. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6, 291. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>
- Li, Q., 2022. Mechanisms for the Invasion and Dissemination of *Salmonella*. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/2655801>
- Li, Y., Yan, H., Zhang, Y., Li, Qingping, Yu, L., Li, Qianyu, Liu, C., Xie, Y., Chen, K., Ye, F., Wang, K., Chen, L., Ding, Y., 2020. Alterations of the Gut Microbiome Composition and Lipid Metabolic Profile in Radiation Enteritis. *Front Cell Infect Microbiol* 10, 541178. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.541178>
- Liu, C., Zhou, N., Du, M.-X., Sun, Y.-T., Wang, K., Wang, Y.-J., Li, D.-H., Yu, H.-Y., Song, Y., Bai, B.-B., Xin, Y., Wu, L., Jiang, C.-Y., Feng, J., Xiang, H., Zhou, Y., Ma, J., Wang, J., Liu, H.-W., Liu, S.-J., 2020. The Mouse Gut Microbial Biobank expands the coverage of cultured bacteria. *Nat Commun* 11, 79. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13836-5>
- Liu, M.-J., Yang, J.-Y., Yan, Z.-H., Hu, S., Li, J.-Q., Xu, Z.-X., Jian, Y.-P., 2022. Recent findings in *Akkermansia muciniphila*-regulated metabolism and its role in intestinal diseases. *Clin Nutr* 41, 2333–2344. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.08.029>
- Liu, Z., Shen, T., Zhang, P., Ma, Y., Qin, H., 2011. *Lactobacillus plantarum* surface layer adhesive protein protects intestinal epithelial cells against tight junction injury induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Biol Rep* 38, 3471–3480. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0457-8>
- Loo, Y.-M., Gale, M., 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 680–692. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>
- Luciani, C., Hager, F.T., Cerovic, V., Lelouard, H., 2022. Dendritic cell functions in the inductive and effector sites of intestinal immunity. *Mucosal Immunol* 15, 40–50. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00448-w>
- Lueschow, S.R., McElroy, S.J., 2020. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Front. Immunol.* 11, 587. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00587>
- Luqman, A., 2018. SadA-Expressing Staphylococci in the Human Gut Show Increased Cell Adherence and Internalization 12.
- Luqman, A., Ebner, P., Reichert, S., Sass, P., Kabagema-Bilan, C., Heilmann, C., Ruth, P., Götz, F., 2019. A new host cell internalisation pathway for SadA-expressing staphylococci triggered by excreted neurochemicals 15.

- Ma, L., Deitch, E., Specian, R., Steffen, E., Berg, R., 1990. Translocation of *Lactobacillus murinus* from the gastrointestinal tract. *Current Microbiology* 20, 177–184. <https://doi.org/10.1007/BF02091994>
- Mace, O.J., Tehan, B., Marshall, F., 2015. Pharmacology and physiology of gastrointestinal enteroendocrine cells. *Pharmacol Res Perspect* 3. <https://doi.org/10.1002/prp2.155>
- Magryś, A., Deryło, K., Bogut, A., Olender, A., Tchórzewski, M., 2018. Intraphagolysosomal conditions predispose to *Staphylococcus epidermidis* small colony variants persistence in macrophages. *PLoS ONE* 13, e0207312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207312>
- Mahenthiralingam, E., Marchbank, A., Drevinek, P., Garaiova, I., Plummer, S., 2009. Use of colony-based bacterial strain typing for tracking the fate of *Lactobacillus* strains during human consumption. *BMC Microbiol* 9, 251. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-251>
- Mahler, G.J., Shuler, M.L., Glahn, R.P., 2009. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability☆. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20, 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.006>
- Mambu, J., Barilleau, E., Fagnet-Trapp, L., Le Vern, Y., Olivier, M., Sadrin, G., Grépinet, O., Taieb, F., Velge, P., Wiedemann, A., 2020. Rck of *Salmonella Typhimurium* Delays the Host Cell Cycle to Facilitate Bacterial Invasion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 586934. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.586934>
- Man, S.M., Karki, R., Kanneganti, T.-D., 2016. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 46, 269–280. <https://doi.org/10.1002/eji.201545839>
- Martin, B.D., Schwab, E., 2012. Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *IJB* 5, p32. <https://doi.org/10.5539/ijb.v5n1p32>
- Mazmanian, S.K., Round, J.L., Kasper, D.L., 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453, 620–625. <https://doi.org/10.1038/nature07008>
- McDonnell, C.J., Garcarena, C.D., Watkin, R.L., McHale, T.M., McLoughlin, A., Claes, J., Verhamme, P., Cummins, P.M., Kerrigan, S.W., 2016. Inhibition of major integrin  $\alpha V\beta 3$  reduces *Staphylococcus aureus* attachment to sheared human endothelial cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14, 2536–2547. <https://doi.org/10.1111/jth.13501>
- Mempel, M., Schnopp, C., Hojka, M., Fesq, H., Weidinger, S., Schaller, M., Korting, H. c., Ring, J., Abeck, D., 2002. Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. *British Journal of Dermatology* 146, 943–951. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2002.04752.x>
- Ménard, S., Lacroix-Lamandé, S., Ehrhardt, K., Yan, J., Grassl, G.A., Wiedemann, A., 2022. Cross-Talk Between the Intestinal Epithelium and *Salmonella Typhimurium*. *Front. Microbiol.* 13, 906238. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.906238>
- MetaHIT Consortium (additional members), Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J.,

- Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- MetaHIT Consortium, Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, Shaochuan, Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, Shengting, Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, Songgang, Qin, N., Yang, H., Wang, Jian, Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, Jun, 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Miyoshi, Y., Okada, S., Uchimura, T., Satoh, E., 2006. A Mucus Adhesion Promoting Protein, MapA, Mediates the Adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 Human Intestinal Epithelial Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70, 1622–1628. <https://doi.org/10.1271/bbb.50688>
- Mizushima, N., Komatsu, M., 2011. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 147, 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- Monk, I.R., Shah, I.M., Xu, M., Tan, M.-W., Foster, T.J., 2012. Transforming the untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* 3, e00277-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00277-11>
- Morikawa, M., Tsujibe, S., Kiyoshima-Shibata, J., Watanabe, Y., Kato-Nagaoka, N., Shida, K., Matsumoto, S., 2016. Microbiota of the Small Intestine Is Selectively Engulfed by Phagocytes of the Lamina Propria and Peyer's Patches. *PLoS ONE* 11, e0163607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163607>
- Mostowy, S., Nam Tham, T., Danckaert, A., Guadagnini, S., Boisson-Dupuis, S., Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P., 2009. Septins Regulate Bacterial Entry into Host Cells. *PLoS ONE* 4, e4196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004196>
- Mylvaganam, S., Freeman, S.A., Grinstein, S., 2021. The cytoskeleton in phagocytosis and macropinocytosis. *Current Biology* 31, R619–R632. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.036>
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., Duskova, J., 2014. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research* 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/476068>
- Nikitas, G., Deschamps, C., Disson, O., Niault, T., Cossart, P., Lecuit, M., 2011. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. *J Exp Med* 208, 2263–2277. <https://doi.org/10.1084/jem.20110560>
- Nishida, A., Nishino, K., Ohno, M., Sakai, K., Owaki, Y., Noda, Y., Imaeda, H., 2022. Update on gut microbiota in gastrointestinal diseases. *WJCC* 10, 7653–7664. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i22.7653>
- Nunez, N., Derré-Bobillot, A., Trainel, N., Lakisic, G., Lecomte, A., Mercier-Nomé, F., Cassard, A.-M., Bierre, H., Serror, P., Archambaud, C., 2022. The unforeseen intracellular lifestyle of *Enterococcus faecalis* in hepatocytes. *Gut Microbes* 14, 2058851. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2058851>

- Oelschlaeger, T.A., Guerry, P., Kopecko, D.J., 1993. Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6884–6888. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6884>
- Oemcke, L.A., Anderson, R.C., Altermann, E., Roy, N.C., McNabb, W.C., 2021. The Role of Segmented Filamentous Bacteria in Immune Barrier Maturation of the Small Intestine at Weaning. *Front. Nutr.* 8, 759137. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.759137>
- Oh, J.-H., Alexander, L.M., Pan, M., Schueler, K.L., Keller, M.P., Attie, A.D., Walter, J., van Pijkeren, J.-P., 2019. Dietary Fructose and Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote Bacteriophage Production in the Gut Symbiont *Lactobacillus reuteri*. *Cell Host Microbe* 25, 273–284.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.016>
- Ohkusa, T., Yoshida, T., Sato, N., Watanabe, S., Tajiri, H., Okayasu, I., 2009. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *Journal of Medical Microbiology* 58, 535–545. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.005801-0>
- Oren, A., Garrity, G.M., 2021. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>
- Osborne, S.E., Brumell, J.H., 2017. Listeriolysin O: from bazooka to Swiss army knife. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160222. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0222>
- Otto, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis* — the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7, 555–567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Paik, S., Kim, J.K., Silwal, P., Sasakawa, C., Jo, E.-K., 2021. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* 18, 1141–1160. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00670-3>
- Pan, C., Liu, J., Wang, H., Song, J., Tan, L., Zhao, H., 2017. *Porphyromonas gingivalis* can invade periodontal ligament stem cells. *BMC Microbiol* 17, 38. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0950-5>
- Pan, F., Zhang, L., Li, M., Hu, Y., Zeng, B., Yuan, H., Zhao, L., Zhang, C., 2018. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammaging effects in calorie-restricted mice. *Microbiome* 6, 54. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0440-5>
- Panse, N., Gerk, P.M., 2022. The Caco-2 Model: Modifications and enhancements to improve efficiency and predictive performance. *International Journal of Pharmaceutics* 624, 122004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122004>
- Paone, P., Cani, P.D., 2020. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* 69, 2232–2243. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>
- Paradis, T., Bègue, H., Basmaciyan, L., Dalle, F., Bon, F., 2021. Tight Junctions as a Key for Pathogens Invasion in Intestinal Epithelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 2506. <https://doi.org/10.3390/ijms22052506>
- Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C., Göker, M., 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>

- Parton, R.G., Tillu, V., McMahon, K.-A., Collins, B.M., 2021. Key phases in the formation of caveolae. *Current Opinion in Cell Biology* 71, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.01.009>
- Peacock, S.J., Foster, T.J., Cameron, B.J., Berendt, A.R., 1999. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* 145, 3477–3486. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-12-3477>
- Pentecost, M., Kumaran, J., Ghosh, P., Amieva, M.R., 2010. *Listeria monocytogenes* Internalin B Activates Junctional Endocytosis to Accelerate Intestinal Invasion. *PLoS Pathog* 6, e1000900. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000900>
- Perdigòn, G., Vintiñi, E., Valdez, J., 2000. Intestinal pathway of internalisation of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. *International journal of immunopathology and pharmacology* 13, 141–150.
- Pereira, E.M., Teixeira, C.A.A., Alvarenga, A.L.M., Schuenck, R.P., Giambiagi-deMarval, M., Holandino, C., Mattos-Guaraldi, A.L., Dos Santos, K.R.N., 2012. A Brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology may adhere to and invade lung epithelial cells. *J Med Microbiol* 61, 463–469. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033001-0>
- Perez, K., Patel, R., 2018. Survival of *Staphylococcus epidermidis* in Fibroblasts and Osteoblasts. *Infect Immun* 86, e00237-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00237-18>
- Peyrusson, F., Varet, H., Nguyen, T.K., Legendre, R., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y., Wolz, C., Tenson, T., Van Bambeke, F., 2020. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nat Commun* 11, 2200. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15966-7>
- Pillon, M., Doublet, P., 2021. Myosins, an Underestimated Player in the Infectious Cycle of Pathogenic Bacteria. *IJMS* 22, 615. <https://doi.org/10.3390/ijms22020615>
- Pinaud, L., Sansonetti, P.J., Phalipon, A., 2018. Host Cell Targeting by Enteropathogenic Bacteria T3SS Effectors. *Trends in Microbiology* 26, 266–283. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.010>
- Pizarro-Cerdá, J., Charbit, A., Enninga, J., Lafont, F., Cossart, P., 2016. Manipulation of host membranes by the bacterial pathogens *Listeria*, *Francisella*, *Shigella* and *Yersinia*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 60, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.07.019>
- Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P., 2018. cell biology of invasion and intracellular growth 16.
- Pöhlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K.B., Döring, G., Lee, J.C., Fournier, J.-M., Botzenhart, K., Wolz, C., 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to Endothelial Cells: Influence of Capsular Polysaccharide, Global Regulator *agr*, and Bacterial Growth Phase. *Infect Immun* 68, 4865–4871. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4865-4871.2000>
- Poreau, B., 2014. [The history of commensalism: a contemporary history of microbiology]. *Hist Sci Med* 48, 61–68.
- Poutrel, B., Mendolia, C., Sutra, L., Fournier, J.M., 1990. Reactivity of coagulase-negative staphylococci isolated from cow and goat milk with monoclonal antibodies to *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8. *J Clin Microbiol* 28, 358–360. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.358-360.1990>

- Puschhof, J., Pleguezuelos-Manzano, C., Clevers, H., 2021. Organoids and organs-on-chips: Insights into human gut-microbe interactions. *Cell Host & Microbe* 29, 867–878. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.002>
- Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., Nir-Paz, R., Herskovits, A.A., 2012. Prophage excision activates *Listeria* competence genes that promote phagosomal escape and virulence. *Cell* 150, 792–802. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.036>
- Ragan, M.V., Wala, S.J., Goodman, S.D., Bailey, M.T., Besner, G.E., 2022. Next-Generation Probiotic Therapy to Protect the Intestines From Injury. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 863949. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.863949>
- Rahmani, S., Breyner, N.M., Su, H.-M., Verdu, E.F., Didar, T.F., 2019. Intestinal organoids: A new paradigm for engineering intestinal epithelium in vitro. *Biomaterials* 194, 195–214. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.12.006>
- Ramiah, K., van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., 2008. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol* 159, 470–475. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.06.002>
- Ravenhill, B.J., Boyle, K.B., von Muhlinen, N., Ellison, C.J., Masson, G.R., Otten, E.G., Foeglein, A., Williams, R., Randow, F., 2019. The Cargo Receptor NDP52 Initiates Selective Autophagy by Recruiting the ULK Complex to Cytosol-Invading Bacteria. *Molecular Cell* 74, 320-329.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.041>
- Regecová, I., Výrostková, J., Zigo, F., Gregová, G., Pipová, M., Jevinová, P., Becová, J., 2022. Detection of Resistant and Enterotoxigenic Strains of *Staphylococcus warneri* Isolated from Food of Animal Origin. *Foods* 11, 1496. <https://doi.org/10.3390/foods11101496>
- Rey, C., Chang, Y.-Y., Latour-Lambert, P., Varet, H., Proux, C., Legendre, R., Coppée, J.-Y., Enninga, J., 2020. Transcytosis subversion by M cell-to-enterocyte spread promotes *Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes* intracellular bacterial dissemination. *PLoS Pathog* 16, e1008446. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008446>
- Rhodin, J., Dalhamn, T., 1956. Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeitschrift für Zellforschung* 44, 345–412. <https://doi.org/10.1007/BF00345847>
- Ribet, D., Cossart, P., 2015. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect* 17, 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004>
- Roberts, J.A., Kruger, P., Paterson, D.L., Lipman, J., 2008. Antibiotic resistance—What’s dosing got to do with it?: *Critical Care Medicine* 36, 2433–2440. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318180fe62>
- Rodriguez, K.R., Bruns, A.M., Horvath, C.M., 2014. MDA5 and LGP2: accomplices and antagonists of antiviral signal transduction. *J Virol* 88, 8194–8200. <https://doi.org/10.1128/JVI.00640-14>
- Rogalla, D., Bomar, P.A., 2022. *Listeria Monocytogenes*, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Rogalski, M.A., Stewart Merrill, T., Gowler, C.D., Cáceres, C.E., Duffy, M.A., 2021. Context-Dependent Host-Symbiont Interactions: Shifts along the Parasitism-Mutualism Continuum. *The American Naturalist* 198, 563–575. <https://doi.org/10.1086/716635>



- Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A., Kamikawa, R., 2017. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology* 27, R1177–R1192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>
- Ross, A.C. (Ed.), 2014. *Modern nutrition in health and disease*, 11th ed. ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Ross, M.H., Pawlina, W. (Eds.), 2016. *Histology: a text and atlas; with correlated cell and molecular biology*, 7. ed. ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, Pa.
- Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y., Tao, F., 2016. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol* 16, 86. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0498-0>
- Salazar, N., González, S., Nogacka, A.M., Rios-Covián, D., Arboleya, S., Gueimonde, M., Reyes-Gavilán, C.G. de los, 2020. Microbiome: Effects of Ageing and Diet. *Current Issues in Molecular Biology* 33–62. <https://doi.org/10.21775/cimb.036.033>
- Sassin, A.M., Johnson, G.J., Goulding, A.N., Aagaard, K.M., 2022. Crucial nuances in understanding (mis)associations between the neonatal microbiome and Cesarean delivery. *Trends in Molecular Medicine* 28, 806–822. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.07.005>
- Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C.A.J., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.-J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., Eberl, G., Di Santo, J.P., 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 29, 958–970. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.001>
- Schrezenmeir, J., de Vrese, M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 361s–364s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s>
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14, e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Roy, N.C., 2013. The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation* 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/237921>
- Shaw, M.H., Kamada, N., Kim, Y.-G., Núñez, G., 2012. Microbiota-induced IL-1 $\beta$ , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *Journal of Experimental Medicine* 209, 251–258. <https://doi.org/10.1084/jem.20111703>
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., Ireton, K., 2000. InlB-Dependent Internalization of *Listeria* Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Cell* 103, 501–510. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00141-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00141-0)
- Shim, K.-Y., Lee, D., Han, J., Nguyen, N.-T., Park, S., Sung, J.H., 2017. Microfluidic gut-on-a-chip with three-dimensional villi structure. *Biomed Microdevices* 19, 37. <https://doi.org/10.1007/s10544-017-0179-y>
- Simon-Assmann, P., Turck, N., Sidhoum-Jenny, M., Gradwohl, G., Kedinger, M., 2007. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol* 23, 241–256. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0175-0>

- Smith, K., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., 2007. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology* 19, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.10.002>
- Smith, S.M., Smith, C.J., 2022. Capturing the mechanics of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Struct Biol* 75, 102427. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102427>
- Speziale, P., Pietrocola, G., 2020. The Multivalent Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in Host Infections. *Front. Microbiol.* 11, 2054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02054>
- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, J.J., 2015. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *SLAS Technology* 20, 107–126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>
- Stagg, A.J., Elisabeth Norin, K., Midtvedt, T., Kamm, M.A., Knight, S.C., Björkstén, B., 2007. Mesenteric dendritic cells from germ-free mice cause less T-cell stimulation but still induce  $\alpha 4\beta 7$  integrin. *Microbial Ecology in Health and Disease* 19, 171–183. <https://doi.org/10.1080/08910600701474263>
- Szabados, F., Kleine, B., Anders, A., Kaase, M., SakÄ±nÄ§, T., Schmitz, I., Gatermann, S., 2008. *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 is internalized into human urinary bladder carcinoma cell line 5637. *FEMS Microbiology Letters* 285, 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01218.x>
- Szczuka, E., Krzywińska, S., Kaznowski, A., 2016. Clonality, virulence and the occurrence of genes encoding antibiotic resistance among *Staphylococcus warneri* isolates from bloodstream infections. *Journal of Medical Microbiology* 65, 828–836. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000287>
- Tangney, M., 2010. Gene therapy for cancer: dairy bacteria as delivery vectors. *Discov Med* 10, 195–200.
- The Human Microbiome Project Consortium, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Torigoe, S., Schutt, C.R., Yamasaki, S., 2021. Immune discrimination of the environmental spectrum through C-type lectin receptors. *International Immunology* 33, 847–851. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab074>
- Tortora, G.J., Derrickson, B.H., 2013. *Principes d’anatomie et de physiologie*, 4e éd., 3e tirage. ed. De Boeck, Bruxelles.
- Tribelli, P.M., Luqman, A., Nguyen, M.-T., Madlung, J., Fan, S.-H., Macek, B., Sass, P., Bitschar, K., Schitteck, B., Kretschmer, D., Götz, F., 2020. *Staphylococcus aureus* Lpl protein triggers human host cell invasion via activation of Hsp90 receptor. *Cellular Microbiology* 22, e13111. <https://doi.org/10.1111/cmi.13111>
- Trouillet, S., Rasigade, J.-P., Lhoste, Y., Ferry, T., Vandenesch, F., Etienne, J., Laurent, F., 2011. A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods* 86, 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.012>
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an

- overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 17, 203–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
- Udayan, S., Stamou, P., Crispie, F., Hickey, A., Floyd, A.N., Hsieh, C.-S., Cotter, P.D., O’Sullivan, O., Melgar, S., O’Toole, P.W., Newberry, R.D., Rossini, V., Nally, K., 2022. Identification of Gut Bacteria such as *Lactobacillus johnsonii* that Disseminate to Systemic Tissues of Wild Type and MyD88<sup>-/-</sup> Mice. *Gut Microbes* 14, 2007743. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2007743>
- Uribe-Querol, E., Rosales, C., 2020. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* 11, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
- Usui, A., Murai, M., Seki, K., Sakurada, J., Masuda, S., 1992. Conspicuous Ingestion of *Staphylococcus aureus* Organisms by Murine Fibroblasts In Vitro. *Microbiology and Immunology* 36, 545–550. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02054.x>
- van Belkum, A., Verkaik, N.J., de Vogel, C.P., Boelens, H.A., Verveer, J., Nouwen, J.L., Verbrugh, H.A., Wertheim, H.F.L., 2009. Reclassification of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Types. *J INFECT DIS* 199, 1820–1826. <https://doi.org/10.1086/599119>
- van der Post, S., Jabbar, K.S., Birchenough, G., Arike, L., Akhtar, N., Sjøvall, H., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., 2019. Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis. *Gut* 68, 2142–2151. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317571>
- VanCleave, T.T., Pulsifer, A.R., Connor, M.G., Warawa, J.M., Lawrenz, M.B., 2017. Impact of Gentamicin Concentration and Exposure Time on Intracellular *Yersinia pestis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 505. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00505>
- Verster, A.J., Ross, B.D., Radey, M.C., Bao, Y., Goodman, A.L., Mougous, J.D., Borenstein, E., 2017. The Landscape of Type VI Secretion across Human Gut Microbiomes Reveals Its Role in Community Composition. *Cell Host & Microbe* 22, 411-419.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.08.010>
- von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E., Locksley, R.M., 2016. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature* 529, 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature16161>
- Voss, O.H., Rahman, M.S., 2021. Rickettsia-host interaction: strategies of intracytosolic host colonization. *Pathogens and Disease* 79, ftab015. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab015>
- Walter, J., 2008. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl Environ Microbiol* 74, 4985–4996. <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-08>
- Wan, F., Zhong, R., Wang, M., Zhou, Y., Chen, Y., Yi, B., Hou, F., Liu, L., Zhao, Y., Chen, L., Zhang, H., 2021. Caffeic Acid Supplement Alleviates Colonic Inflammation and Oxidative Stress Potentially Through Improved Gut Microbiota Community in Mice. *Front Microbiol* 12, 784211. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.784211>
- Wells, K.M., He, K., Pandey, A., Cabello, A., Zhang, D., Yang, J., Gomez, G., Liu, Y., Chang, H., Li, X., Zhang, H., Feng, X., da Costa, L.F., Metz, R., Johnson, C.D., Martin, C.L., Skrobarczyk, J., Berghman, L.R., Patrick, K.L., Leibowitz, J., Ficht, A., Sze, S.-H., Song, J., Qian, X., Qin, Q.-M., Ficht, T.A., de Figueiredo, P., 2022. *Brucella* activates the host RIDD pathway to

subvert BLOS1-directed immune defense. *Elife* 11, e73625.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.73625>

- Xu, J., Liang, R., Zhang, W., Tian, K., Li, J., Chen, X., Yu, T., Chen, Q., 2020. *Faecalibacterium prausnitzii* -derived microbial anti-inflammatory molecule regulates intestinal integrity in diabetes mellitus mice via modulating tight junction protein expression. *Journal of Diabetes* 12, 224–236. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12986>
- Xu, S., Jin, T., Weng, J., 2022. Endothelial Cells as a Key Cell Type for Innate Immunity: A Focused Review on RIG-I Signaling Pathway. *Front. Immunol.* 13, 951614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.951614>
- Yang, J., Park, J., Park, S., Baek, I., Chun, J., 2019. Introducing Murine Microbiome Database (MMDB): A Curated Database with Taxonomic Profiling of the Healthy Mouse Gastrointestinal Microbiome. *Microorganisms* 7, E480. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110480>
- Yang, Y.-H., Jiang, Y.-L., Zhang, J., Wang, L., Bai, X.-H., Zhang, S.-J., Ren, Y.-M., Li, N., Zhang, Y.-H., Zhang, Z., Gong, Q., Mei, Y., Xue, T., Zhang, J.-R., Chen, Y., Zhou, C.-Z., 2014. Structural Insights into SraP-Mediated *Staphylococcus aureus* Adhesion to Host Cells. *PLoS Pathog* 10, e1004169. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004169>
- Yang, Z., Liu, X., Wu, Y., Peng, J., Wei, H., 2022. Effect of the Microbiome on Intestinal Innate Immune Development in Early Life and the Potential Strategy of Early Intervention. *Front. Immunol.* 13, 936300. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.936300>
- Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Ye, X., Liu, Y., Hu, J., Gao, Y., Ma, Y., Wen, D., 2021. Chlorogenic Acid-Induced Gut Microbiota Improves Metabolic Endotoxemia. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12, 762691. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.762691>
- Yissachar, N., Zhou, Y., Ung, L., Lai, N.Y., Mohan, J.F., Ehrlicher, A., Weitz, D.A., Kasper, D.L., Chiu, I.M., Mathis, D., Benoist, C., 2017. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell* 168, 1135-1148.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.009>
- Yokoi, K., Sugahara, K., Iguchi, A., Nishitani, G., Ikeda, M., Shimada, T., Inagaki, N., Yamakawa, A., Taketo, A., Kodaira, K.-I., 2008. Molecular properties of the putative autolysin AtlWM encoded by *Staphylococcus warneri* M: Mutational and biochemical analyses of the amidase and glucosaminidase domains. *Gene* 416, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.03.004>
- Yu, L.C.-H., 2015. Commensal bacterial internalization by epithelial cells: An alternative portal for gut leakiness. *Tissue Barriers* 3, e1008895. <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1008895>
- Yu, Y., Raka, F., Adeli, K., 2019. The Role of the Gut Microbiota in Lipid and Lipoprotein Metabolism. *JCM* 8, 2227. <https://doi.org/10.3390/jcm8122227>
- Yuan, T., Wang, J., Chen, L., Shan, J., Di, L., 2020. *Lactobacillus murinus* Improved the Bioavailability of Orally Administered Glycyrrhizic Acid in Rats. *Front. Microbiol.* 11, 597. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00597>

- Zawistowska-Rojek, A., Tyski, S., 2018. Are Probiotic Really Safe for Humans? *Pol J Microbiol* 67, 251–258. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-044>
- Zelmer, D.A., 1998. An evolutionary definition of parasitism. *International Journal for Parasitology* 28, 531–533. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00199-9)
- Zhang, Z., Lv, J., Pan, L., Zhang, Y., 2018. Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 8135–8143. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9217-9>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O’Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, S., Gravekamp, C., Bermudes, D., Liu, K., 2018. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer. *Nat Rev Cancer* 18, 727–743. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0070-z>

# Annexes

## Communication orale 17ème congrès de la SFM :

### Internalisation de bactéries commensales du microbiote dans les cellules intestinales

Robin Louail<sup>1</sup> (robin.louail@univ-rouen.fr), Franklin Florin<sup>1</sup>, Sophie Bernard<sup>2</sup>, Jean-Baptiste Michaud<sup>1</sup>, Jonathan Breton<sup>1,3</sup>, Najate Achamrah<sup>1,3</sup>, Marie-Pierre Tivolacci<sup>1,4</sup>, Moïse Coëffier<sup>1,3</sup>, David Ribet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR INSERM 1073 Nutrition, Inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau, Univ. de Rouen Normandie, Rouen, France

<sup>2</sup>PRIMACEN, Université de Rouen Normandie, Rouen, France

<sup>3</sup>Service de Nutrition, CHU de Rouen, Rouen, France

<sup>4</sup>CIC-CRB 1404, CHU de Rouen, Rouen, France

### Introduction et objectifs :

Le tube digestif est le siège de nombreuses interactions entre les bactéries du microbiote et les cellules de l'épithélium intestinal. Notre vision actuelle de ces interactions est binaire avec d'un côté les bactéries commensales et symbiotiques proliférant dans la lumière intestinale et communiquant avec l'hôte via la sécrétion de divers métabolites et, d'un autre côté, les bactéries pathogènes dont certaines sont capables de pénétrer à l'intérieur des entérocytes.

Nous proposons de remettre en question cette vision dichotomique en faisant l'hypothèse que certaines bactéries commensales/symbiotiques auraient la capacité de s'internaliser dans les cellules intestinales et modifieraient la physiologie des entérocytes.

### Méthodes :

Nous avons mis en place un protocole de criblage de bactéries du microbiote ayant la capacité de pénétrer dans les cellules épithéliales intestinales. Ce protocole repose sur la co-incubation de bactéries du microbiote avec des lignées de cellules intestinales *in vitro*. L'utilisation d'antibiotiques (gentamicine et imipénem) ne pouvant pas traverser les membranes des cellules eucaryotes permet ensuite d'éliminer les bactéries strictement extracellulaires sans affecter les bactéries s'étant internalisées. Les bactéries intracellulaires sont ensuite isolées et caractérisées par séquençage. Des expériences complémentaires de coculture entre ces bactéries d'intérêt et les cellules intestinales sont alors réalisées pour approfondir les caractéristiques de cette internalisation.

### Résultats, discussion et conclusion :

Nous avons identifié plusieurs espèces bactériennes du microbiote capables de s'internaliser dans les entérocytes. L'une de ces espèces, *Staphylococcus warneri*, est capable d'envahir les cellules intestinales en utilisant un mécanisme actine-dépendant. Contrairement aux bactéries pathogènes, *S. warneri* ne prolifère pas dans les cellules intestinales. Ces résultats valident notre hypothèse initiale selon laquelle il existerait des bactéries non pathogènes dans le microbiote capables de s'internaliser dans les cellules intestinales. Ces travaux mettent en évidence un nouveau type d'interaction hôte-bactéries au niveau intestinal et ouvrent de nouveaux axes de recherche pour caractériser l'impact de ces événements d'internalisation sur la physiologie des cellules intestinales.

**Mots clés :** Microbiote intestinal - Bactéries intracellulaires - Intéractions hôte-bactéries - *Staphylococcus*.

## Communication orale 24ème édition des Journées de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (ED 497) :

### **When non-pathogenic bacteria enter the cells: evidence for new host-microbiota interactions in the guts**

Robin Louail, Franklin Florin, Sophie Bernard, Jean-Baptiste Michaud, Jonathan Breton, Najate Achamrah, Marie-Pierre Tivolacci, Moïse Coëffier, David Ribet<sup>1</sup>

Over the last decade, the human gut microbiota has gained increasing interest among the scientific community and, as a consequence, among the general public. Trillions of bacteria are living in the human intestine. These bacteria interact with human cells and are essential for human health. Indeed, various pathologies have been linked with disequilibrium in microbiota composition. Host-bacteria interactions in the human intestine are currently depicted as dichotomic with commensals on one side, remaining in the intestinal lumen in physiological conditions, and pathogens on the other side, which may adhere and then enter into intestinal cells. In order to challenge this binary concept of host-bacteria interactions, we screened the gut microbiota to identify commensal bacteria which may actively invade intestinal cells. Using classic gentamicin assay and transmission electron microscopy, we identified one staphylococcal species, *Staphylococcus warneri*, as being a natural member of the human gut microbiota able to invade intestinal cells using actin-dependent mechanisms. In contrast to professional pathogens, *S. warneri* does not actively replicate within intestinal cells and does not resist killing by macrophages. Together, our results highlight the invasive potential of common bacteria from the human gut microbiota and provide evidence for a new type of bacteria-host relationship, which constitutes an intermediate situation between strictly extracellular intestinal commensals and invading pathogens.

Keywords: host-bacteria interactions; gut microbiota; intracellular bacteria; internalization; Staphylococcus



## LOUAIL Robin - Doctorant

10 rue Daniel Porée  
76320 Saint-Pierre-Lès-Elbeuf  
07.81.73.44.40  
robinlouail@gmail.com

### Formation

- 2019- Actuel : Doctorant (3<sup>ème</sup>) – Université de Rouen Normandie - UMR 1073 ADEN (Directeur : Pr. Moïse Coëffier), Rouen.**  
« Invasion de l'épithélium intestinal par des bactéries commensales du microbiotes et impact sur la physiologie intestinale » - Directeur de thèse : Dr. David Ribet
- 2018 :** **Master II – Microbiologie Fondamentale et Appliquée**, Université de Bretagne Occidentale, Brest (mention TB)
- 2014 :** **Master II – Sciences Biomédicales Spécialités Neurosciences et Sciences des Comportements**, Université de Basse-Normandie, Caen
- 2012 :** **Licence - Physiologie et Biologie Cellulaire**, Université de Rouen Normandie, Rouen

### Expériences en laboratoire

- 2019 :** **Stage M2 – UMR 1073 (Dir : Pr. Déchelotte)**, Rouen 6 mois.  
« Etude de l'internalisation de bactéries commensales dans les cellules intestinales »
- 2018 :** **Stage M1 : LMSM (Dir : Pr. M. Feuilloley)**, Evreux, 2 mois.  
« Etude de l'effet du NO<sub>2</sub> sur la production des espèces réactives de l'oxygène chez une souche bactérienne du microbiote cutané par cytométrie en flux »
- 2014 :** **Stage M2 : UMR 1077 (Dir : Pr. F. Eustache)**, Caen, 6 mois.  
« Cognition et cancer : Etude en imagerie structurale (IRMa) avant et après chimiothérapie »
- 2013 :** **Stage M1 : Shalgrenska Cancer Center (Dir : Pr. J. Nilsson)**, Goteborg, 4 mois.  
« Association du facteur Notch avec les gènes de la famille FET »

### Enseignements et autres activités

- 2022 :** **Enseignements Travaux Pratiques d'Histologie (L1 ; 46H)**
- 2021 - 2022 :** **Encadrements de Master I**
- 2020-2021 :** **Organisation des 23<sup>ème</sup> Journées de l'Ecole Doctorale 497**

### Compétences

- Culture cellulaire :** Culture de lignées immortalisées ; Culture bactérienne ; Travail en enceinte anaérobie ; Clonage
- Biologie moléculaire :** Extraction ADN, ARN et protéines ; RT-qPCR/PCR ; Western Blot
- Logiciel :**
- |                       |  |
|-----------------------|--|
| Bureautique :         | Suite Office (Word, Excel, Powerpoint) |
| Statistiques :        | GraphPad Prism                         |
| Traitement d'images : | Gimp, ImageJ/Fiji                      |
| Bioinformatique :     | Serial cloner UniProt, Mothur          |
- Programmation :** Python ; C ; R ; Matlab

## Congrès scientifiques

- 2022 :**        **17<sup>ème</sup> congrès national de la SFM - Communication orale (sélection)**  
« Internalisation de bactéries commensales du microbiote dans les cellules intestinales »
- 2022 :**        **24<sup>ème</sup> édition des Journées de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (497) - Communication orale (sélection)**  
« When non-pathogenic bacteria enter the cells : evidence for new host-microbiota interactions in the guts »

## Publications

- **Invasion of intestinal cells by *Staphylococcus warneri*, a resident of the human gut microbiota** (Soumis à Gut Pathogens)  
Robin Louail, Franklin Florin, Sophie Bernard, Jean-Baptiste Michaud, Jonathan Breton, Najate Achamrah, Marie-Pierre Tivolacci, Moïse Coëffier, David Ribet
  
- **Invasion of enterocytes by intestinal *Lactobacillaceae*** (manuscrit en cours d'écriture)  
Robin Louail, Amélie Cresson, Léa Loison, Nadine Montbrion, Moïse Coëffier, David Ribet