



HAL
open science

Caractérisation de deux bactéries commensales intestinales : *Bacteroides fragilis* et *Roseburia intestinalis*

Thomas Gautier

► To cite this version:

Thomas Gautier. Caractérisation de deux bactéries commensales intestinales : *Bacteroides fragilis* et *Roseburia intestinalis*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB005 . tel-04191224

HAL Id: tel-04191224

<https://theses.hal.science/tel-04191224>

Submitted on 30 Aug 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : *Microbiologie, Virologie, Parasitologie*

Par

Thomas Gautier

Caractérisation de deux bactéries commensales intestinales :
Bacteroides fragilis et *Roseburia intestinalis*

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 2 février 2023.

Unité de recherche : UMR 1241 - NuMeCan

Rapporteurs avant soutenance :

Jean-Marc Châtel
Isabelle Virlogeux-Payant

Directeur de Recherche à l'INRAE, Ile-de-France
Directrice de recherche à l'INRAE, Val de Loire, Tours

Composition du Jury :

Président : Yves Le Loir
Examineurs : Jean Marc Châtel
Isabelle Virlogeux-Payant
Geneviève Héry-Arnaud

Directeur de Recherche à l'INRAE, Rennes
Directeur de Recherche à l'INRAE, Ile-de-France
Directrice de recherche à l'INRAE, Val de Loire, Tours
Professeur des Universités, Université de Brest

Dir. de thèse : Latifa Bousarghin
Co-encadrante de thèse : Sandrine Le Gall David

Enseignant-chercheur Université de Rennes 1
Enseignant-chercheur Université de Rennes 1

Remerciements

Je voulais dans un premier temps remercier, DR Isabelle Virlogeux-Payant, DR Jean Marc Châtel, DR Yves Le Loir et le Pr Geneviève Héry-Arnaud pour avoir accepté de juger et d'évaluer mes travaux. Merci pour le temps accordé que vous m'avez accordé.

Je voudrais dire un grand merci à Latifa Bousarghin et Sandrine David-Le Gall. Vous m'avez très bien accueilli, dès le début de la thèse, alors que je ne connaissais pas du tout le laboratoire de NUMECAN. Vous m'avez accompagné pendant trois ans et je pense avoir été encadré de la meilleure des manières, pour que je puisse poursuivre ma carrière scientifique. Merci pour toutes les connaissances scientifiques que vous m'avez transmises. De plus, vous m'avez également formé à l'enseignement pendant 3 années consécutives, ce qui m'a convaincu d'envisager un poste d'enseignant-chercheur. Je voulais vous remercier aussi pour votre côté humain formidable, bienveillant et votre bonne humeur. Vous avez été prêtes à m'aider dans les bons comme dans les mauvais moments, tout en laissant une certaine liberté dans le suivi de la thèse. Merci de m'avoir fait aimer la recherche.

Je voulais remercier tous les membres qui ont fait partie de mon Comité de suivi individuel : Sergine Even, Sophie Tomasi, Frédérick Derbré et Pierre Germon. Merci pour vos conseils et votre bienveillance.

Merci à l'Université de Rennes 1 pour avoir financé mes travaux et à l'école doctorale pour le suivi administrative de ma thèse.

De manière globale, merci à toutes les personnes avec qui j'ai échangé au sein de NUMECAN. Je commencerais tout d'abord par l'équipe METHER.

Je souhaitais remercier le directeur de NUMECAN, Olivier Loréal, merci pour vos conseils, vous avez su m'aider pendant certains coups durs de la thèse.

Merci Virginie, tu as été avec moi pendant 1 an et demi, on a partagé ensemble nos doutes et nos délires, on aura également passé de bons moments à sortir à l'extérieur du laboratoire et c'était un plaisir de partager cela avec toi. Merci à Garance, Gwenal, Léa, Priscilia, Mathis et Ophélie qui ont passé 6 mois en ma compagnie. Merci aux techniciennes Nolwenn et Catherine, avec qui j'ai partagé mon bureau pendant la moitié du temps de la thèse, qui ont su répondre aux questions. Merci Nolwenn et Patricia pour toute l'aide, au cours de la manipulation des souris qui a été très intense, (6h00-17h00 sans boire ni manger à certains moments). Merci à Zohreh, Vincent M, Vincent L, Isabelle, Pascal, Pascale, Aude et toutes les personnes qui sont passées me voir, ou me parler au cours de ma thèse.

Merci, Gentiana, grâce à toi j'ai pu apprendre à parler et comprendre l'anglais, alors que je parlais de très loin, ... On a également partagé nos doutes, mais je retiendrais surtout ton côté solaire et ta curiosité scientifique débordante qui m'a marqué, tu mérites une belle carrière.

Un grand merci à tous les doctorants de l'institut, nos fous-rire et nos sorties dans les bars. J'ai été accompagné d'une très bonne équipe pour sortir du côté professionnel

Thomas, on s'est suivi tout le long, team intestin, je ne pourrais pas énumérer toutes les expressions qu'on a ressorti de ces 3 années : "comment on fait là" "tout l'monde me l'dit" "courir comme un titan" "il y a eu une volonté de m'humilier" etc... et pour les mardis soir chez toi à la colloc On se sera suivi tout le long, la preuve, on soutient à une semaine d'écart. Un grand merci à Vincent

aussi, notre cuisinier hors-pair qui démarre sa thèse, merci pour ta bienveillance et les moments de galères partagées (je n'ai pas de thune moi).

Merci à Kilian, j'ai appris à te découvrir, après quelques semaines, tu fais partie de mon cercle proche de NuMeCan, d'ailleurs, j'attends toujours les instructions pour le premier cours de plongée.

Merci à Lise aussi, avec qui j'ai partagé ces 3 années, je me souviendrais toujours de nos répétitions de manau "la tribu de Dana" en soirée ou en déplacement à l'ED-BS.

Merci aux anciens doctorants pour leur accueil, qui m'ont aidé avant et après leur thèse : Yann, Yoann, Elise et Julien, merci pour vos conseils et pour les moments de détente en dehors du laboratoire.

Merci à tous les autres doctorants et stagiaires qui ont partagé l'aventure de laboratoire : Youenn, Clémence, Sarah, Sarah, Hanadi, Hugo, Kévin, Giovanna, Lucie, Marine, Fabien... on aura formé une sacrée team de doctorants.

Merci à mes parents, à mes sœurs Julie et Salomé pour votre soutien sans faille, je sais que vous serez toujours là pour moi.

Merci à toi Iléana, tu m'as accompagné pendant toute ma thèse, et tu m'as toujours soutenu, tu as su me supporter dans les moments durs comme joyeux et je veux continuer à vivre tous ces moments à tes côtés.

Merci à toi Maxou, tu as été la personne qui m'a le plus appris pendant ma thèse, sur la philosophie, et les sujets en tous genres, mais aussi à passer des moments avec nos passions communes comme boire des bières à l'aviateur, prendre des taulés au babyfoot et les analyses de parties d'échecs et de tennis.

Merci à tous mes amis Angevins : Antonin, Valbuen, Tom, Maud, Bastos, Clémence, Dondon, Louison, Romu, Margaux, Paul, Lucie, Agathe, Lohanna, Madina, Simon, Gildas.

Je tenais aussi à remercier aussi mes amis vendéens, avec qui j'ai passé des moments de détente incroyable, merci d'avoir supporté les explications et la vulgarisation de mon sujet de thèse et de la biologie en général. Et comme disait un célèbre proverbe, de Maitre Eddy Graveleau: "Si le camembert coule c'est qu'il ne sait pas nager"

Merci à tous mes amis de Master de Tours et particulièrement à toi Clara, tous les appels que nous sommes passés, pour débriefer de nos situations personnelles et professionnelles m'ont fait du bien.

Merci à toutes les personnes de mon entourage, famille et amis, qui ont sûrement été à l'écoute pendant ces trois années.

Table des matières

Listes des Figures	7
Listes des Tables	7
Liste des Abréviations :	8
I) Présentation de l'intestin	12
I.1) Description générale de l'intestin	12
I.1.1) Le duodénum	13
I.1.2) Le jéjunum	13
I.1.3) L'iléon	14
I.1.4) Le côlon	14
I.2) L'épithélium intestinal.....	15
I.2.1) L'épithélium intestinal constitue une barrière physique	16
I.2.2) L'épithélium intestinal constitue une barrière chimique.....	21
I.2.3) L'épithélium intestinal possède une fonction d'absorption	24
I.2.4) L'épithélium intestinal possède une fonction endocrine.....	26
I.2.5) L'épithélium intestinal possède une fonction immunitaire	29
I.2.6) Organisation de l'immunité autour de l'épithélium intestinal	35
I.2.7) Les moyens d'études de l'épithélium intestinal : la relation hôte/micro-organismes	37
1.2.7.1) Modèles <i>in vivo</i>	37
1.2.7.2) Modèles <i>in vitro</i>	38
1.2.7.2.1) Les lignées cellulaires primaires.....	38
1.2.7.2.2) Les lignées cellulaires immortalisées	39
1.2.7.2.3) Le système « Gut-on-a-chip »	41
1.2.7.2.4) Les organoïdes.....	42
I.3) Le microbiote intestinal.....	44
I.3.1) Définition et rôle du microbiote intestinal.....	44
I.3.2) Mise en place et évolution du microbiote intestinal	48
I.3.3) Moyens d'études du microbiote intestinal	51
I.3.4) Dysbioses.....	53
I.3.4.1) Définition d'une dysbiose	53

I.3.4.2) Facteurs de dysbioses	54
I.3.4.2.1) La diversité génétique	55
I.3.4.2.2) Le régime alimentaire	56
I.3.4.2.3) Les antibiotiques	56
I.3.5) Exemples de dysbioses associées à des pathologies humaines.....	57
I.3.5.1) MICI	60
I.3.5.2) Cancer colorectal.....	63
I.3.5.3) Obésité et Diabète de type 2	64
I.4) Les entérobactéries.....	65
I.4.1) <i>Salmonella</i>	66
I.4.1.1) virulence.....	67
1.4.1.1.1) L'adhésion	68
1.4.1.1.2) L'invasion.....	70
1.4.1.1.3) La translocation.....	75
I.4.1.2) Traitements à l'aide antibiotiques et limites	78
I.5) Les probiotiques	79
I.5.1) Définition.....	79
I.5.2) Les probiotiques traditionnels : <i>Lactobacillus</i> et <i>Bifidobacterium</i>	79
I.5.3) Les probiotiques de nouvelle génération et leurs métabolites	82
I.5.4) Les métabolites bactériens communiquent avec les autres organes	90
II) Les probiotiques de nouvelle génération et leurs métabolites, moyen de communication dans l'axe intestin-poumons.....	92
III) Les métabolites produits par <i>Bacteroides fragilis</i> inhibent la virulence et la persistance de <i>Salmonella</i>	108
IV) <i>Roseburia intestinalis</i> module l'expression de PYY dans un nouveau modèle quadri-cellulaire comprenant des cellules entéro-endocrines	135
V) Discussion générale et perspective	157
VI) Références	169

Listes des Figures

Figure 1 : Composition des différents compartiments intestinaux..	12
Figure 2 : Organisation simplifiée de l'épithélium intestinal.	17
Figure 3 : Organisation des jonctions cellulaires au sein de l'épithélium intestinal.	18
Figure 4 : Les cellules de Gobelet sécrètent du mucus.	22
Figure 5 : Les entérocytes.	24
Figure 6 : Activités des hormones sécrétées par les cellules entéro-endocrines.	27
Figure 7 : L'activité antimicrobienne des cellules de Paneth.	30
Figure 8 : Activité des cellules M.	33
Figure 9 : Composition de l'épithélium de l'intestin grêle et le côlon.	34
Figure 10 : Organisation des Plaques de Peyer.	35
Figure 11 : Représentation du système Transwell®.	40
Figure 12 : Répartition des phyla majoritaires du microbiote intestinal.	46
Figure 13 : Evolution des phyla majoritaires dans l'intestin en fonction de l'âge.	49
Figure 14 : Analyse du gène 16S bactérien.	52
Figure 15 : Facteurs de dysbiose.	54
Figure 16 : Influence de la composition du microbiote intestinal sur la réponse inflammatoire et les MICI.	62
Figure 17 : Classification du genre <i>Salmonella</i> .	66
Figure 18 : Invasion des cellules intestinales par <i>Salmonella</i> .	68
Figure 19 : Schéma d'un flagelle de <i>Salmonella</i> .	69
Figure 20 : Rôle des effecteurs du SST3-1 de <i>Salmonella</i> dans les cellules épithéliales.	70
Figure 21 : Fonctions des effecteurs du SST3-2 de <i>Salmonella</i> dans les cellules épithéliales et les cellules phagocytaires.	74
Figure 22 : Dissémination de <i>Salmonella</i> .	76
Figure 23 : Métabolites produits par les PNGs.	84
Figure 24 : Mise en place du modèle tri-cellulaire.	110
Figure 25 : Le modèle quadri-cellulaire.	137

Listes des Tables

Tableau 1 : Bactéries du microbiote intestinal variantes dans les pathologies intestinales chroniques	58
Tableau 2 : Effets de l'administration de souches de <i>Lactobacillus</i> et de <i>Bifidobacterium</i> dans l'intestin.	81

Liste des Abréviations :

SNE : Système nerveux entérique

PdPs : Plaques de Peyer

PAMs : Peptides anti-microbiens

Cellules M : Microfold cells

JAMs : junctional adhesion molecules

ZOs : Zona oclludens

GAP : GTPase protéine

MAPK : Mitogen-activated proteins kinases

kDA : kilodalton

Dsg2 : Desmogléine 2

Cx : Connexines

TFF : Trefoild factor

SI : sucrase-isomaltase

LPS : Lipopolysaccharide

TLRs : Toll-like receptors

NLRs : Nod-like receptors

NF-κB : Nuclear factor- κB

PRRs : Pattern recognition receptors

TNF-α : Tumor necrosis factor-α

IL-8 : interleukine 8

CCK : Cholécystokinine

5-HT : Sérotonine

GLP-1 : Glucagon-like peptide 1

PYY : Peptide YY

CHGA : Chromogranine A

DT2 : Diabète de type 2

NPY : neuropeptide Y

RegIIIy : regenerating islet-derived protein IIIy

sPLA2 : Phospholipase 2

IgA : Immunoglobuline type A

HD : Human defensins

GP2 : Glycoprotéine 2

GALTs : Gut-associated lymphoid tissues

LBS : Lymphocytes B

LThs : Lymphocytes helper

LTreg : Lymphocyte T régulateur

UFC/mL : Unité formant colonie par millilitre

16S rRNA : sous-unité ribosomale 16S bactérienne

kB : kilobases

NGS : Next-generation sequencing

CD : Maladie de Crohn

VDR : Vitamine D receptor

NOD2 : nucleotide-binding oligomerization domain 2

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

NK : Natural Killer

HFD : High fat diet

ETBF : Enterotoxigénique Bacteroides fragilis

NTBF : Nontoxigénique Bacteroides fragilis

CU : Colite ulcéreuse

IFN-γ : Interféron gamma

CRC : cancer colorectal

pks : polyketide synthase

AVC : Accidents vasculaires cérébraux

TIAC : Toxi-infections alimentaires collectives

SST3 : Système de sécrétion de type III

SPI: *Salmonella* pathogenicity island type 1

SCV : *Salmonella* containing vacuole

MPR : récepteur du mannose-6-phosphate

OLS : Organes lymphoïdes secondaires

MMR : Methyl mismatch repair

HM : Hypermutatrice

PNG : Probiotique de nouvelle génération

AGCC : Acides gras à chaînes courtes

mM : millimolaire

PSA : Polysaccharide A

MAMs : Molécules anti-inflammatoires microbiennes

BfPAI : B. fragilis pathogenicity island

ILC : cellules lymphoïdes innées

TNBS : 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique

CSE1L : chromosome segregation 1-like

IDO-1 : indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase

PDL-1 : programmed death-ligand 1

ACTH : adrénocorticotrope

SPF : specific pathogen-free

BDNF : brain-derived neurotropic factor

OMS : Organisme mondial de la santé

DAT : Désaminotyrosine

IFNAR : récepteurs des interféron- α/β

CDCA : Chenodésoxycholique

UDCA : Ursodésoxycholique

HDCA : Hyodésoxycholique

EHEC : E. coli entérohémorragiques

HPLC : Chromatographie en phase liquide haute performance

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1

GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor

LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

CA : Acide cholique

DCA : acide désoxycholique

RT-qPCR : Real-Time quantitative PCR

TEER : Résistance électrique transepithéliale

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

BSH : Bile salt hydrolase

GCA : Acide glycocholique

TCA : Acide taurocholique

EPEC : E. coli entéro-pathogènes

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

RMN : Résonance magnétique nucléaire

I) Présentation de l'intestin

I.1) Description générale de l'intestin

L'intestin est un organe digestif retrouvé chez les vertébrés. Il est composé de l'intestin grêle et du gros intestin. L'intestin grêle est compartimenté en 3 fragments ayant des rôles spécifiques : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le gros intestin est dans le prolongement de l'intestin grêle, il est lui-même composé du cœcum et du côlon (figure 1). Ces fragments de l'intestin ont chacun un rôle qui leur est propre. Des différences dans l'organisation cellulaire, la physiologie et leurs fonctions sont retrouvées entre l'intestin grêle et le côlon.

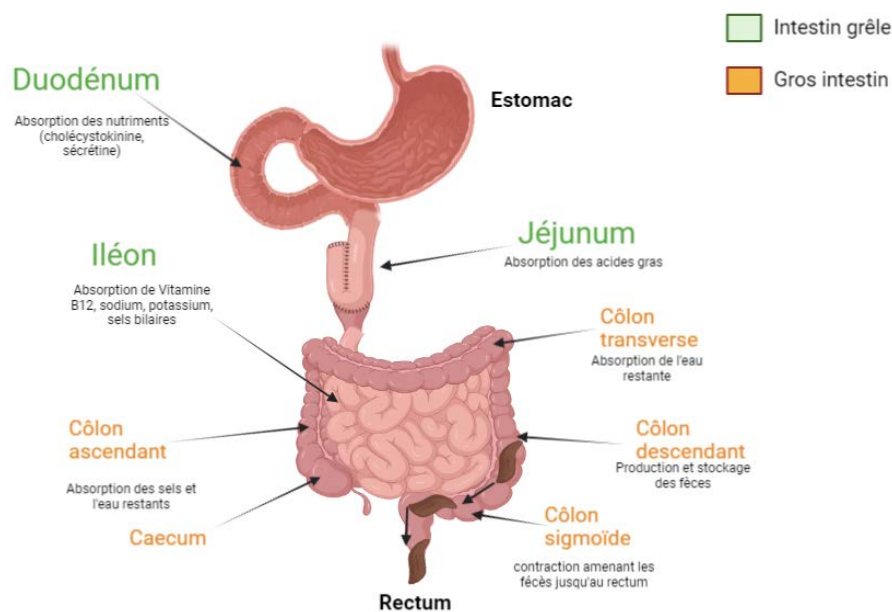


Figure 1 : Composition des différents compartiments intestinaux. L'intestin est divisé en deux parties : l'intestin grêle (en vert) et le gros intestin (en orange). Les aliments sont préalablement digérés par l'environnement de l'estomac. Les nutriments passent ensuite dans le duodénum qui assure l'absorption des premiers nutriments, à l'aide de la sécrétine et de la cholecystokinine. Le second segment appelé le jéjunum assure l'absorption des acides gras. L'iléon permet l'absorption de la vitamine B12, des sels et acides gras. Le gros intestin constitué du cœcum, côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant et le côlon sigmoïde, absorbe les restes des nutriments et les sels non absorbés par l'intestin grêle. Les derniers déchets sont évacués sous forme de fèces par contraction musculaire qui rejoignent le rectum puis sont évacués à l'extérieur du corps (Figure créée à partir de Biorender).

I.1.1) Le duodénum

Le duodénum est situé en haut de l'intestin grêle et fait donc le lien avec l'estomac (figure 1). Il complète la première phase de digestion et est contrôlé par la valve entre l'intestin et l'estomac appelée pylore. L'épithélium du duodénum est composé de 4 couches. La couche muqueuse comporte des microvillosités permettant l'absorption des nutriments. La couche sous-muqueuse composée de tissu conjonctif est irriguée par les vaisseaux sanguins ainsi que les nerfs. La couche musculaire externe, permet le passage des aliments vers le jéjunum et la couche séreuse, comprenant l'épithélium pavimenteux pour former la barrière intestinale du duodénum (1). Au sein du duodénum, a lieu la digestion, assurée par les enzymes digestives et les sucs intestinaux. Le duodénum régule également le pH de l'intestin via la sécrétion de la sécrétine. La cholécystokinine est produite pour faciliter la digestion et l'absorption des nutriments (1). Le duodénum utilise également la bile produite par la vésicule biliaire, le foie et le pancréas pour faciliter la digestion.

I.1.2) Le jéjunum

Le jéjunum est situé juste en dessous du duodénum (figure 1). Il est la partie la plus longue de l'intestin grêle et la partie médiane de l'intestin grêle. De la même manière que les autres parties de l'intestin grêle, le jéjunum est composé de cryptes et de villosités. C'est dans le jéjunum que la majorité de l'absorption des lipides et acides gras (non digérés par le duodénum) a lieu. Au même titre que le duodénum, le jéjunum abrite peu de micro-organismes contrairement au côlon (2). Le jéjunum et le duodénum possèdent une faible quantité d'organes lymphoïdes et ne sont donc pas des acteurs majeurs de l'immunité intestinale (3).

I.1.3) L'iléon

L'iléon est le dernier composant de l'intestin grêle. Il est constitué majoritairement d'entérocytes et de cellules de Gobelet sécrétant du mucus, lui conférant ainsi une activité de barrière chimique et mécanique. La principale particularité de l'iléon est l'ajout d'une composante immunitaire avec la présence de plaques de Peyer (PdPs) sous l'épithélium (plus de 50% de l'intestin grêle). L'iléon participe à l'absorption de la vitamine B12, des acides gras (mais moins que le jéjunum), du sodium, du potassium, ainsi que des sels biliaires (4).

I.1.4) Le côlon

Le gros intestin (ou côlon) est le dernier maillon du tube digestif avant le rectum. Il mesure environ 1,5 mètre de long, ce qui représente un cinquième de la longueur du tube digestif. Il est composé de 5 parties : le cæcum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde (figure 1). Le cæcum est une poche située à la scission de l'intestin grêle (iléon) et du côlon. La paroi interne du cæcum est composée d'une épaisse couche de mucus. Le rôle du cæcum, du côlon ascendant et transverse est d'absorber les restes d'eau. Le côlon descendant produit et stocke les fèces qui s'évacueront ensuite par le rectum. Le côlon sigmoïde induit la contraction péristaltique permettant d'éjecter les fèces dans le rectum (figure 1) (5).

Le rôle principal du côlon est l'absorption d'eau, des vitamines et des électrolytes. Les derniers déchets sont transformés en fèces. Les bactéries présentes dans le côlon produisent la vitamine K, ayant un rôle antihémorragique et la vitamine B, impliquée dans la production d'énergie (6). Le côlon est la partie de l'intestin la plus innervée. La surface d'absorption ne contient pas de villosité comme l'intestin grêle. En effet, le système nerveux entérique (SNE) contrôle le colon par le système

sympathique et parasympathique (7). Le côlon contient aussi une organisation immunitaire spécifique pour réagir en cas de danger dans l'intestin.

1.2) L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal constitue la plus large surface de muqueuse du corps humain (400 m²). Il est situé entre la lumière intestinale et la *lamina propria*. Un épithélium intestinal intègre se replie sous forme de villosités. Il n'est pas linéaire et se caractérise par la présence de cryptes, comprenant des cellules souches, qui permettront la régénération de l'épithélium intestinal pour remplacer les cellules en dégénérescence (8). Les cellules épithéliales intestinales représentent une couche unique, d'une épaisseur de 20 µm. Elles régulent l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes.

L'épithélium intestinal est le lieu de nombreux échanges entre divers acteurs, et possède de nombreuses fonctions. La couche de cellules intestinales est une couche unique plissée, structurée en cryptes qui jouent un rôle de protection (barrière physicochimique). Cet épithélium intestinal permet d'absorber les produits de la digestion (9). Il est indispensable pour de nombreux processus, tels que l'absorption d'eau et de nutriments, l'élimination de substances potentiellement dangereuses, la surveillance immunologique et la protection contre les agents agressifs. L'épithélium intestinal forme une barrière physique, mais permet le passage de certaines molécules présentes dans la lumière intestinale, vers la *lamina propria*. Ainsi, les molécules, dont la taille est inférieure à 600 Da, passent par la voie paracellulaire, et celles de taille plus imposante passent par la voie transcellulaire, soit par endocytose ou par exocytose (10).

L'épithélium intestinal est composé de différents types cellulaires ayant un rôle précis et spécifique. Certaines cellules ont un rôle d'absorption : les entérocytes. D'autres ont des propriétés sécrétoires qui diffèrent selon le type cellulaire : les cellules de Gobelets sécrètent le mucus, les cellules

de Paneth sécrètent des peptides anti-microbiens (PAMs) permettant la protection de la muqueuse intestinale contre les organismes. Les cellules entéro-endocrines sécrètent des hormones qui peuvent jouer un rôle sur les autres organes. L'épithélium doit également assurer le renouvellement des types cellulaires par les cellules souches intestinales situées au fond des cryptes (figure 2). La protection de l'intestin est assurée par une composante immunitaire : les Microfold cells (cellules M) sont rattachées à un réseau de cellules spécialisées dans l'immunité, contenues dans les laques de Peyer (PdPs) (11).

1.2.1) L'épithélium intestinal constitue une barrière physique

Les cellules de l'épithélium les plus abondantes sont les entérocytes (intestin grêle) et les colonocytes (côlon). Ces cellules représentent 80% des cellules de l'épithélium intestinal (38). La membrane entérocytaire comporte des microvillosités nécessaires à l'endocytose de différentes protéines (39). Les entérocytes sont constamment maintenus entre eux par plusieurs types de jonctions cellulaires. Ces jonctions sont liées au squelette intracellulaire et interagissent avec des protéines régulatrices. Ces dernières vont permettre l'adhésion cellule-cellule, pour former une barrière mécanique et assurer une perméabilité intestinale convenable, afin de lutter contre d'éventuels agents étrangers comme les micro-organismes pathogènes (figure 3).

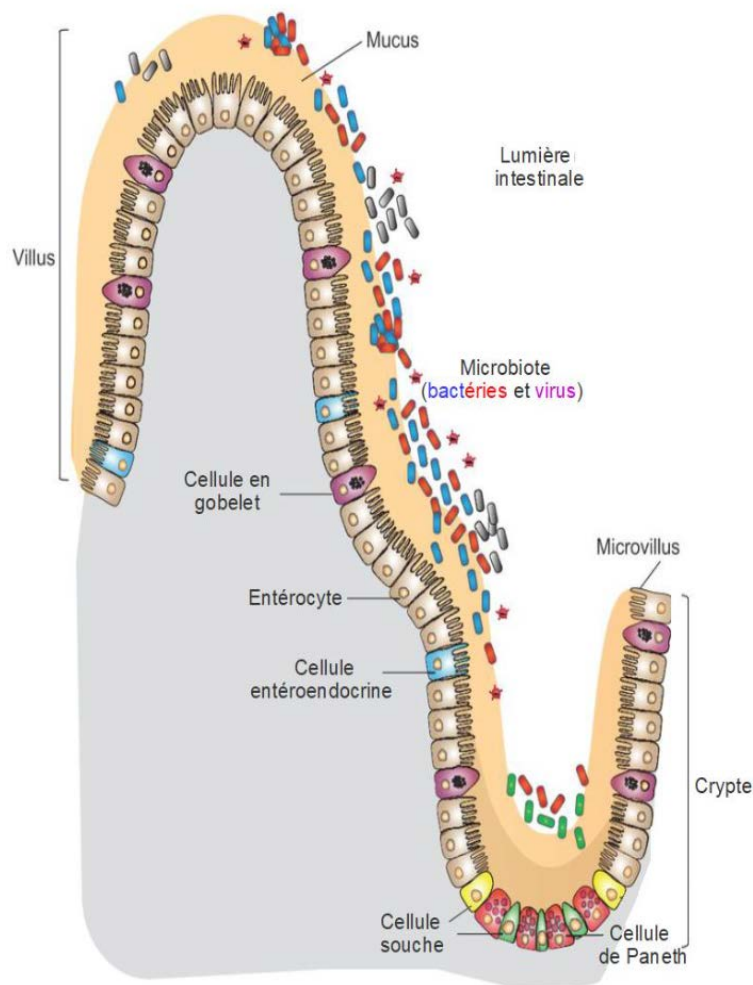


Figure 2 : Organisation simplifiée de l'épithélium intestinal. (Selon Wong *et al* 2016) : L'épithélium intestinal est composé de cryptes et de villosités. Au fond des cryptes, les cellules souches permettent le renouvellement de l'épithélium. Ces cellules souches peuvent se différencier en entérocytes ou en cellules de Gobelet. Les cellules de Gobelet sont réparties tout le long de l'épithélium et sécrètent un mucus permettant de limiter les interactions avec les micro-organismes. Les cellules souches peuvent également se différencier en cellules de Paneth, qui restent au fond des cryptes. Les cellules de Paneth sécrètent des peptides anti-microbiens (PAMs), dégradant les micro-organismes qui se rapprochent de l'épithélium intestinal. Les cellules entéro-endocrines, plus rares, sont réparties tout le long de l'épithélium et sécrètent des hormones qui auront un effet régulateur sur d'autres molécules contenues dans l'intestin et dans d'autres organes.

1) Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont composées de plus de 40 molécules transmembranaires incluant différentes familles de protéines : les Claudines, l'Occludine et les « junctional adhesion molecules » (JAMs) formant des ponts entre les cellules (12). Les jonctions serrées appartiennent les cellules et sont responsables du maintien du passage paracellulaire des protéines, des ions et des nutriments. Les jonctions serrées permettent de maintenir une polarité cellulaire convenable, pour favoriser le passage des ions (figure 3) (13).

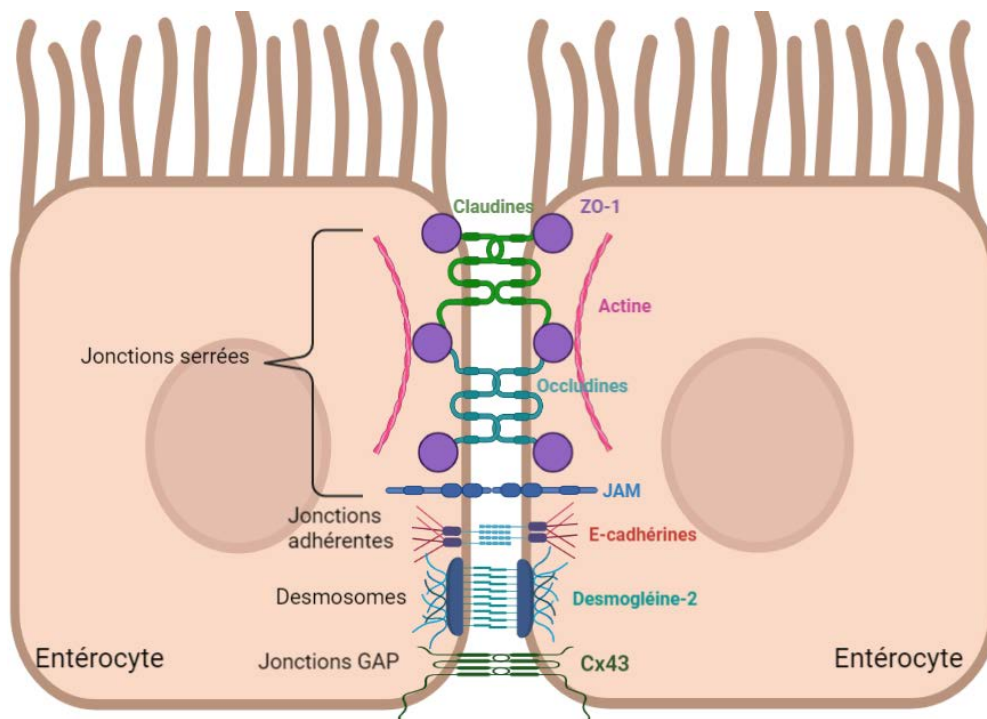


Figure 3 : Organisation des jonctions cellulaires au sein de l'épithélium intestinal. Les jonctions cellulaires sont représentées par des **jonctions serrées** composées des Claudines, des Occludines ainsi que des JAM sont reliées aux « zona occludens » (ZO). Les ZO sont reliées au cytosquelette en se fixant sur l'actine, et font également partie des jonctions serrées. Elles permettent le contrôle du passage des molécules contenues dans la lumière intestinale vers la *lamina propria*. Les **jonctions adhérentes** sont formées par les E-cadhérines contrôlant les phénomènes d'invasion cellulaire d'un côté ou de l'autre de l'intestin. Les desmosomes formés par la Desmogléine-2 et les jonctions GTPase protéine (GAP) sont des jonctions mécaniques importantes dans le remodelage et les phénomènes physiologiques et métaboliques de la cellule (Figure créée à partir de Biorender).

1a) Les Claudines

La famille des Claudines regroupent 27 protéines (chez l'humain) ayant une taille de 20 et 27 kilodaltons (kDa) (14). Les Claudines permettent le contrôle de la voie paracellulaire des ions, de quelques petites protéines, qui passent en fonction de leur taille et leurs charges. Leurs variations d'expression peuvent altérer l'assemblage et la fonction des jonctions serrées. La phosphorylation des Claudines par les kinases comme « Mitogen-activated protein kinases » (MAPK) peut amener à une diminution de la perméabilité de l'épithélium intestinal, leur régulation est donc très importante pour maintenir l'intégrité de la barrière intestinale (15).

1b) Les protéines JAMs

Les protéines JAMs appartiennent à la famille des immunoglobulines. Elles sont impliquées dans le signal de transduction, dans la régulation et le recrutement des jonctions serrées, comme l'Occludine (16). Les JAMs ont également un rôle dans l'angiogénèse et dans l'inflammation en régulant l'infiltration des leucocytes (17).

1c) Les Zona occludens

La famille « Zona Occludens » (ZOs) contient trois protéines identifiées : ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Ces protéines ont été les premières découvertes parmi les jonctions serrées. ZO-1 et ZO-2 sont reliées au cytosquelette par l'actine et sont exprimées dans l'épithélium, tandis que ZO-3 est exprimée dans l'épithélium et l'endothélium. Elles participent au recrutement des Claudines et de l'Occludine et sont le support cellulaire de la barrière intestinale (18).

1d) L'Occludine

L'Occludine est une protéine transmembranaire de 65 kDa. Les ZO assurent la stabilité des jonctions Occludines entre les cellules (19)(figure 3). L'expression et la signalisation de l'Occludine est régulée négativement par l'expression de Raf-1 (20). L'Occludine a un rôle indispensable dans la stabilité des jonctions serrées et participe donc à l'intégrité de la barrière intestinale (21).

Les jonctions serrées sont indispensables pour le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal et la régulation des molécules qui le traverse (figure 2). L'infection par des pathogènes intestinaux, comme les bactéries ou parasites, peut conduire à la rupture des jonctions serrées, favorisant leur dissémination (22). Pour exemple, les bactéries à Gram négative peuvent sécréter des protéases, lipases ou phosphatases qui dégradent les jonctions serrées. Elles peuvent ensuite passer au travers de l'épithélium intestinal (23).

2) Les jonctions adhérentes

En plus des jonctions serrées, il existe d'autres types de jonctions. Les jonctions adhérentes sont composées de glycoprotéines E-cadhérine, elles sont essentielles pour la jonction cellule-cellule, permettent d'empêcher l'invasion des pathogènes intestinaux et inhibent la diapédèse des leucocytes (figure 3) (24). Les jonctions adhérentes comprennent les desmosomes, assemblés par la protéine Desmogléine 2 (Dsg2) (figure 3). Les desmosomes jouent un rôle dans la cohésion cellulaire et sont indispensables au maintien mécanique de la barrière intestinale. Ils ont également un rôle dans le remaniement du cytosquelette et l'apoptose (25). Les desmosomes sont régulés par la voie de signalisation p38MAPK (26). Les jonctions adhérentes impliquent aussi les jonctions GTPase protéine (GAP), qui jouent un rôle dans l'échange d'ions tels que K^+ , Ca^{2+} et des petits métabolites (comme le glucose) entre les cellules adjacentes. Les jonctions GAP sont codées par une famille de gènes nommée

connexines (Cx43, Cx46 et Cx26). Elles sont essentielles pour maintenir la physiologie de la cellule au cours de sa différenciation, sa croissance et la coordination métabolique (27).

Les différents types de jonctions forment une barrière entre les cellules, permettant le contrôle mécanique, physiologique, électrique et le contrôle de la perméabilité intestinale. Ces jonctions assurent le maintien de la morphologie des cellules au sein de l'intestin (figure 3).

1.2.2) L'épithélium intestinal constitue une barrière chimique

En plus de la barrière physique constituée par les jonctions intercellulaires, il y a également d'autres cellules qui vont jouer un rôle de barrière chimique. Ce sont les cellules de Gobelet (appelées aussi caliciformes). Ces cellules représentent environ 4% des cellules intestinales dans l'intestin grêle contre 16% dans le côlon (28). Leur nombre est variable, et leur différenciation peut être dépendante du microbiote intestinal. Leur rôle principal est la sécrétion de mucine. Les mucines sont des glycoprotéines formant l'élément principal de la couche de mucus (figure 4) (29). L'épaisseur de la couche du mucus est croissante du duodénum au côlon.

1a) Les mucines

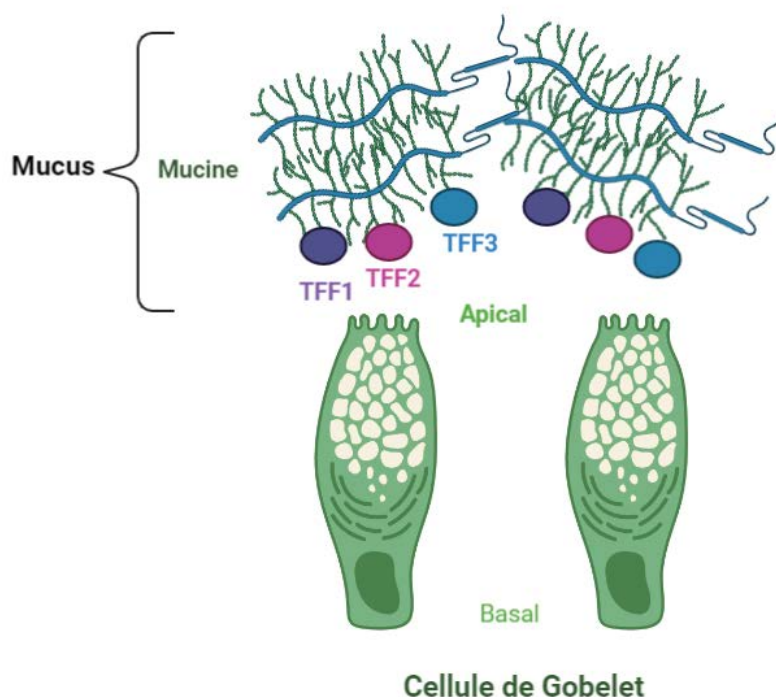


Figure 4 : Les cellules de Gobelet sécrètent du mucus. Les cellules de Gobelet sécrètent le mucus au niveau du pôle apical (lumière intestinale). Le mucus se compose de mucines, elles-mêmes composées par plus de 21 protéines (Muc1 à Muc21). Les mucines s'associent entre elles pour former une barrière chimique imperméable aux bactéries. Le mucus contient également les « Trefoil factors » (TFF1 à TFF3) qui servent de support aux mucines. Les TFFs favorisent la cicatrisation de l'épithélium intestinal, en cas de dommage (Figure créée à partir de Biorender).

Les mucines sont glycosylées au sein de l'appareil de Golgi, puis stockées dans des vésicules et granules spécifiques situées sur la phase apicale des cellules de Gobelet (figure 3). Les mucines sont fortement hydrophiles, ce qui permet de fixer l'eau et d'éviter un contact trop rapproché entre les micro-organismes colonisant l'intestin et les entérocytes (36). Il existe plus de 21 mucines (Muc1 à Muc21). Au sein de l'intestin, Muc2, Muc5AC, Muc5B, Muc6 et Muc19 sont essentielles pour former la muqueuse intestinale (30). Muc2 est la principale mucine intestinale sécrétée chez l'Homme et la souris (31). La diminution de l'expression de Muc2 entraîne une augmentation de l'inflammation, due

à un accroissement de la proximité des pathogènes intestinaux avec la barrière épithéliale. Le relargage des mucines est contrôlé par des facteurs bactériens, des facteurs de croissance et des cytokines inflammatoires. Les bactéries régulent la production de Muc2 de manière directe, en adhérant aux cellules via leurs lipopolysaccharides (LPS), ce qui active la voie inflammatoire « Nuclear factor- κ B »(NF- κ B) (32). Le TNF- α active la sécrétion de Muc2. La sécrétion du mucus peut intervenir dans le cas d'une activation de l'inflammation (33).

1b) Les TFFs

La formation du gel de mucus n'implique non seulement les mucines, mais aussi les « Trefoil factor » (TFFs), qui sont des peptides en forme de trèfle participant aussi à la constitution de la couche de mucus. Les TFFs sont composés par TFF1, TFF2 et TFF3 chez l'Homme (34). Les TFFs sont sécrétés dans le mucus et jouent un rôle de protection de la barrière intestinale, permettant l'homéostasie et la réparation de la muqueuse intestinale (figure 4) (35). Dans les cas de pathologies inflammatoires chroniques, les TFFs sont fortement exprimés pour pallier l'inflammation exacerbée par le microbiote intestinal (36). Les cellules de Gobelet sécrètent une couche de mucus protégeant de manière chimique l'interaction entre les micro-organismes et la barrière intestinale. L'épaisseur de la couche de mucus varie en fonction de l'environnement cytokinique et inflammatoire de l'intestin.

1.2.3) L'épithélium intestinal possède une fonction d'absorption

Les entérocytes jouent un rôle dans l'absorption des macromolécules. Des enzymes sont exprimées à la surface des entérocytes, permettant la reconnaissance des macromolécules qui sont ensuite internalisées par transcytose, puis dégradées par les lysosomes. Les macromolécules regroupent les nutriments alimentaires, les polysaccharides ou les antigènes bactériens, contenus dans la lumière intestinale (figure 5) (37).

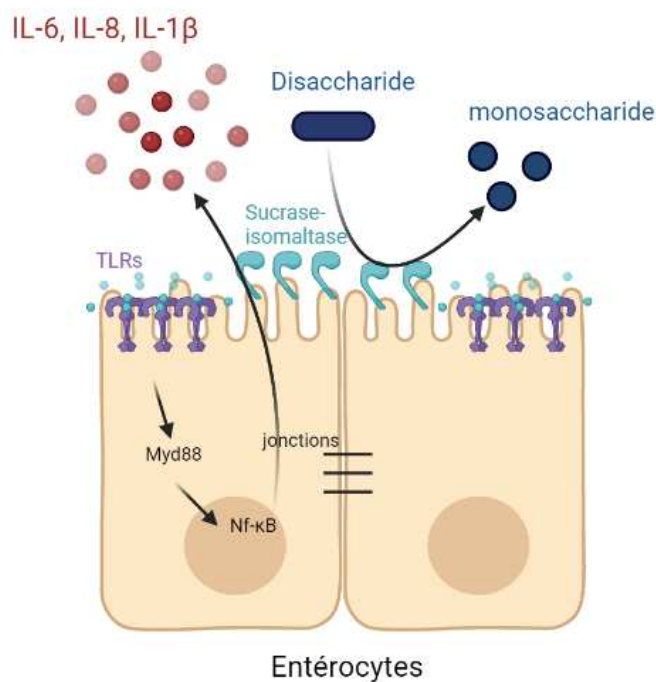


Figure 5 : Les entérocytes. Les entérocytes présentent des microvillosités à leurs surfaces et sont reliées entre-elles par les jonctions intercellulaires. L'enzyme sucrase-isomaltase (SI), présente au niveau de ces villosités, permet la digestion des polysaccharides en monosaccharide. « Les toll like receptor » (TLRs) captent les molécules antigéniques. L'interaction entre les TLRs et les antigènes active une cascade d'activation, provoquant la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces médiateurs préviennent les cellules immunitaires du danger dans l'intestin (Figure créée par Biorender).

La Sucrase-Isomaltase (SI) est une enzyme spécifique de la bordure des villosités des entérocytes (38). Elle permet de catalyser l'étape finale de digestion des carbohydrates en décomposant les di-oligosaccharides en monosaccharides absorbables (39). Une inhibition de la

synthèse de la SI engendre une malabsorption des sucres, pouvant conduire à des diarrhées et des vomissements (40).

La Phosphofructokinase isoenzyme permet le transfert du glucose vers la circulation sanguine (41). La Lactase induit le clivage des polyphénols (tels que les flavonoïdes). La Phosphatase alcaline est une glycoprotéine permettant l'absorption des lipides intestinaux, la détoxification des nucléotides et du LPS bactérien et réduit l'inflammation systémique (42).

Les entérocytes présentent à leur surface, des récepteurs d'agents étrangers. Le contact des corps étrangers avec ces récepteurs aboutit à une cascade d'activation intracellulaire menant à l'activation d'une réponse inflammatoire. Ces récepteurs transmembranaires sont appelés « Toll-like receptor » (TLRs) et « NOD-like receptor » (NLRs). Les TLRs sont localisés à la surface des cellules ou dans les endosomes/lysosomes, alors que les NLRs sont essentiellement intracellulaires. Les TLRs et NLRs font partie des « Pattern Recognition Receptors » (PRRs) permettant la reconnaissance des micro-organismes. La reconnaissance des bactéries intestinales par les PRRs conduit à l'activation de la cascade MyD88 déclenchant le facteur de transcription NF- κ B. La cascade induit la production de cytokines pro-inflammatoires avec la sécrétion de cytokines spécialisées dans la réponse pro-inflammatoire innée impliquant « Tumor necrosis factor α » (TNF- α), l'interleukine 8 (IL-8), l'IL-6 et l'IL-1 β . Ces cytokines participent à la différenciation et au recrutement des leucocytes pour lutter contre des corps étrangers, présents dans l'intestin. Le type de réponse inflammatoire dépend de l'antigène rencontré. En plus de leur rôle digestif et d'absorption, les entérocytes jouent un rôle d'alerte, pour la mise en place d'une réaction inflammatoire, permettant d'éradiquer un micro-organisme dangereux pour l'intestin, par exemple.

1.2.4) L'épithélium intestinal possède une fonction endocrine

La fonction endocrine de l'intestin est assurée par les cellules entéro-endocrines. Elles représentent moins de 1% de la population cellulaire intestinale. Les cellules entéro-endocrines colonisent l'intestin, de l'estomac au rectum et elles sont généralement plus représentées dans l'intestin grêle que dans le côlon (43). Elles sont caractérisées par la présence de vésicules sécrétoires similaires à celles des neurones, ainsi que de neuropodes au niveau du pôle basal (figure 5). Ces vésicules contiennent plusieurs molécules qui vont avoir un impact à distance, c'est-à-dire sur d'autres organes comme le cerveau. Les vésicules sécrétoires contiennent la Gastrine, la Ghréline, la Cholécystokinine (CCK), la Sérotonine (5-HT), le « Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), le Peptide YY (PYY) et la Chromogranine A (CHGA) (figure 6) (44).

Ces vésicules sont relarguées en réponse à différents stimuli. Les cellules entéro-endocrines de l'estomac sécrètent la Gastrine. C'est une petite hormone qui induit la croissance de la muqueuse gastrique. Elle permet la conversion du pepsinogène en pepsine menant à la décomposition des protéines contenues dans les aliments consommés (45). La Ghréline est une hormone fabriquée dans l'estomac permettant le contrôle de l'appétit et la régulation de la voie de sécrétion du glucose dans le sang (46).

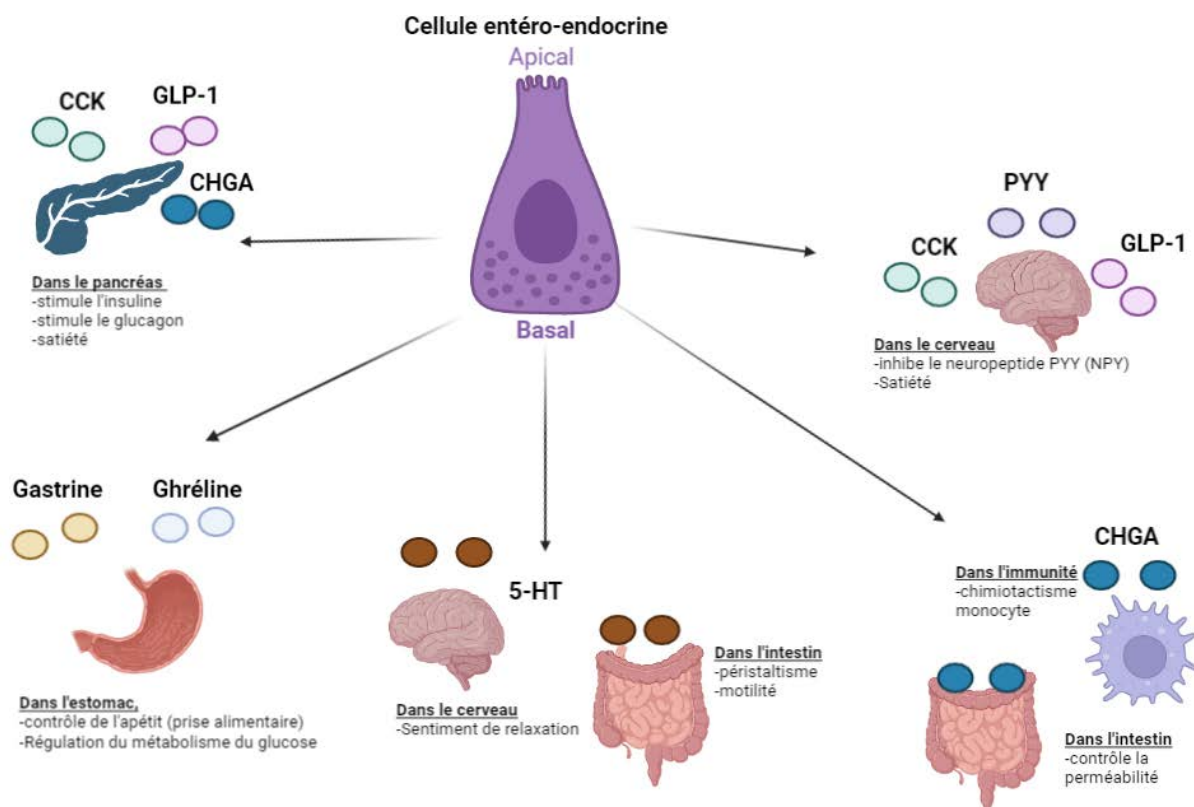


Figure 6 : Activités des hormones sécrétées par les cellules entéro-endocrines. Les cellules entéro-endocrines sécrètent différentes hormones, contenues dans des vésicules, orientées vers le pôle basal (pour alimenter la circulation sanguine) qui ont des activités sur l'intestin et sur d'autres organes. Les principales hormones sont : La Gastrine et la Ghréline (Estomac) ; CCK, GLP-1 et CHGA (pancréas) ; 5-HT (cerveau et intestin) ; CCK, PYY, GLP-1 (cerveau) ; CHGA (intestin et immunité). (Figure créée par Biorender).

La Somatostatine est un peptide cyclique qui régule négativement la sécrétion de toutes les hormones endocriniennes, lorsque celles-ci ne sont plus nécessaires pour le corps. Elle agit comme un neurotransmetteur pour inhiber les hormones produites par l'hypothalamus, le pancréas, la thyroïde, le tractus intestinal et le système nerveux central (47).

Le Peptide CCK inhibe la sécrétion d'acides dans l'estomac et stimule la sécrétion enzymatique du pancréas. En effet, il stimule la production d'insuline et de glucagon, et induit la sensation de satiété (48). Il contrôle la motilité et la longueur de l'intestin (49).

La Sérotonine (5-HT) est un neurotransmetteur associé au système nerveux central. La moitié de la 5-HT est produite dans le cerveau et l'autre moitié par l'intestin. La 5-HT passe ensuite dans la

circulation sanguine pour rejoindre l'encéphale, en traversant la barrière hémato-encéphalique, où elle va se fixer sur des récepteurs spécifiques. La fixation de la 5-HT à son récepteur induit un sentiment de relaxation (50). Une diminution de la production de 5-HT est corrélée à des problèmes neurologiques comme l'apparition d'anxiété et de dépression. La 5-HT est aussi impliquée dans le péristaltisme et la motilité de l'intestin (51).

GLP-1 est encodée par le gène *gcg*. C'est une incrétine qui amène la production d'insuline dans le pancréas. Sa sécrétion a pour effet de diminuer la glycémie dans la circulation sanguine et induire le sentiment de satiété (52). Elle est actuellement utilisée en injection pour traiter les patients atteints de diabète de type 2 (DT2).

PYY est un peptide de 36 acides aminés. Deux peptides principaux PYY ont été identifiés : PYY1-36 et PYY3-36. Après la prise alimentaire, les deux peptides PYY sont fortement présents dans la circulation sanguine (53). Par compétition, PYY1-36 et PYY3-36 ont un rôle d'inhibition du neuropeptide Y (NPY), en se fixant sur les récepteurs Y1, Y2 et Y5 spécifiques de NPY, dans l'hypothalamus. PYY1-36 inhibe Y1, Y2 et Y5 tandis que PYY3-36 inhibe Y2. NPY a un effetorexigénique et stimule la prise alimentaire. En bloquant l'accès à NPY sur ses récepteurs spécifiques, PYY induit donc la diminution de la prise alimentaire et le sentiment de satiété (54).

CHGA est une hormone qui exerce un rôle dans l'homéostasie du calcium et régule aussi la perméabilité intestinale. Elle régule la sécrétion d'insuline périphérique et son absence est corrélée à une augmentation des phénomènes d'obésité lorsqu'elle est absente chez les souris *CHGA* KO (Knock Out) (55). CHGA contrôle aussi les activités physiologiques du système immunitaire en stimulant le chimiotactisme des monocytes dans le sang périphérique humain. Sa présence est liée aux pathologies inflammatoires intestinales chroniques malgré des mécanismes encore flous (56).

Par les sécrétions de différentes hormones, les cellules entéro-endocrines assurent les mouvements digestifs dans l'estomac et l'intestin. Elles contrôlent la sécrétion hormonale générale dans le corps humain et font le lien entre l'intestin et les autres organes comme le cerveau ou le cœur. Elles peuvent donc réguler la satiété et l'humeur par PYY et la 5-HT. Des défauts de sécrétions peuvent amener à l'obésité ou le DT2, car elles régulent les mécanismes de sécrétions d'insuline, du glucagon et contrôlent ainsi indirectement la glycémie. Les cellules entéro-endocrines sont très importantes pour la régulation intestinale et extra-intestinale.

1.2.5) L'épithélium intestinal possède une fonction immunitaire

1a) Les cellules de Paneth

L'épithélium intestinal comporte également les cellules de Paneth, présentes chez l'Homme et d'autres espèces de vertébrés comme la souris. Elles sont localisées dans le fond des cryptes de Lieberkühn dans l'épithélium de l'intestin grêle chez l'Homme et absentes dans le côlon. Ces cellules sont spécialisées dans la défense antimicrobienne (57). La particularité physiologique des cellules de Paneth est la présence de granules contenant de nombreuses protéines et des peptides antimicrobiens (PAMs), qui contrôlent la réponse inflammatoire et la lutte contre les pathogènes intestinaux. Parmi les PAMs, il y a les α -défensines, le lysozyme, l'interleukine-1 β , « Regenerating islet derived protein III γ » (RegIII γ), la Phospholipase 2 (sPLA2) ou encore l'Immunoglobuline A (IgA), présentée sous forme de propeptide puis clivée en forme active (figure 7) (58).

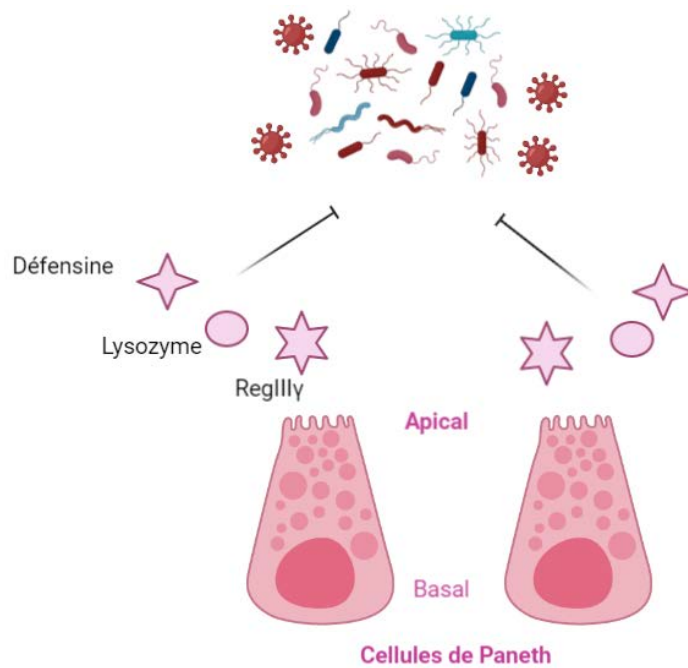


Figure 7 : L'activité antimicrobienne des cellules de Paneth. Les cellules de Paneth sont en première ligne dans la réponse contre la prolifération des micro-organismes intestinaux. Elles sécrètent une multitude de peptides anti-microbiens (PAMs) : les défensines, le lysozyme et RegIII γ (Figure créée à partir de Biorender).

Chez l'Homme, il y a deux types d' α -défensines : « Human defensin 5 » (HD5) et « Human defensin 6 » (HD6). HD5, HD6, le lysozyme et sPLA2 ont un effet direct sur la membrane des micro-organismes. L'IgA contient deux sites de reconnaissance antigéniques. Elles vont pouvoir neutraliser les bactéries en se fixant sur les antigènes au sein de la lumière intestinale. Les bactéries sont ensuite éliminées par le flux intestinal (59). HD5 et HD6 ont un effet bactéricide en inhibant la synthèse des acides nucléiques, des protéines et de l'activité enzymatique (60). RegIII γ est une lectine antibactérienne nécessaire pour limiter les pathogènes intestinaux (61). Les protéines RegIII γ stimulent l'intensité de l'expression des TLRs, et peuvent donc stimuler la réponse inflammatoire pour lutter contre les pathogènes (62).

1b) Les cellules Tuft

D'autres cellules comme les cellules Tuft vont jouer un rôle dans l'immunité intestinale (63). Dans l'intestin, elles sont localisées dans l'intestin grêle (64). Elles sont caractérisées par de longues microvillosités au niveau du pôle apical et des neuropodes au niveau du pôle basal. Pou2f3 est un marqueur permettant de différencier les cellules Tuft des autres cellules intestinales (65). Ce sont les premières cellules à répondre aux stimuli, suite à l'attaque d'un pathogène. Elles sont spécialisées dans l'immunité de type 2 correspondant à une réponse antiparasitaire (66).

1c) Les cellules M

Il existe un autre type cellulaire très fortement relié au système immunitaire, les cellules M, qui font le lien entre la lumière intestinale et les PdPs. À partir des cellules souches, la différenciation des cellules M est effectuée dans un environnement physiologique contenant la cytokine RANKL (ligand du récepteur de l'activateur de NF- κ B), exprimée spécifiquement sous les dômes de l'épithélium, qui comprennent les follicules lymphatiques (tels que les PdPs) (67). La différenciation des cellules souches en cellules M est fortement liée à la présence de cellules immunitaires et plus précisément des lymphocytes B (LBs) et lymphocytes T helper (LThs) (68). Les cellules M ont une morphologie très spécifique. Contrairement aux entérocytes, elles possèdent un glycocalyx moins exprimé qui réduit considérablement la taille des microvillosités, mais confère toutefois une protection importante contre les agents agressifs. Le lien entre les cellules M et les PdPs s'effectue sur la reconnaissance des antigènes par un récepteur spécifique à la surface des cellules M : la glycoprotéine 2 (GP2). Par le biais de ce récepteur, les cellules M sont capables d'effectuer la phagocytose et la transcytose de certaines macromolécules de la lumière intestinale vers la *lamina propria*. Le phénomène de transcytose correspond à l'internalisation, par les cellules M, des antigènes de la

lumière intestinale qui sont délivrés jusqu'aux PdPs se trouvant sous l'épithélium intestinal. Les antigènes sont ensuite présentés aux cellules immunitaires. En effet, la membrane basolatérale des cellules M est en contact avec une grande majorité de population lymphocytaire, de leucocytes mononucléaires effectuant le phénomène de phagocytose. Elles sont également en contact avec les cellules dendritiques, connues comme présentatrices d'antigènes professionnelles (figure 8) (69). Les cellules M peuvent aussi être le point d'entrée de certaines bactéries, qui sont capables d'effectuer le phénomène de translocation à travers ces cellules épithéliales, pour ensuite se disséminer dans l'organisme (70,71). Les cellules M font le lien entre l'épithélium intestinal et les PdPs, elles sont donc un des acteurs majeurs dans l'homéostasie de l'immunité intestinale.

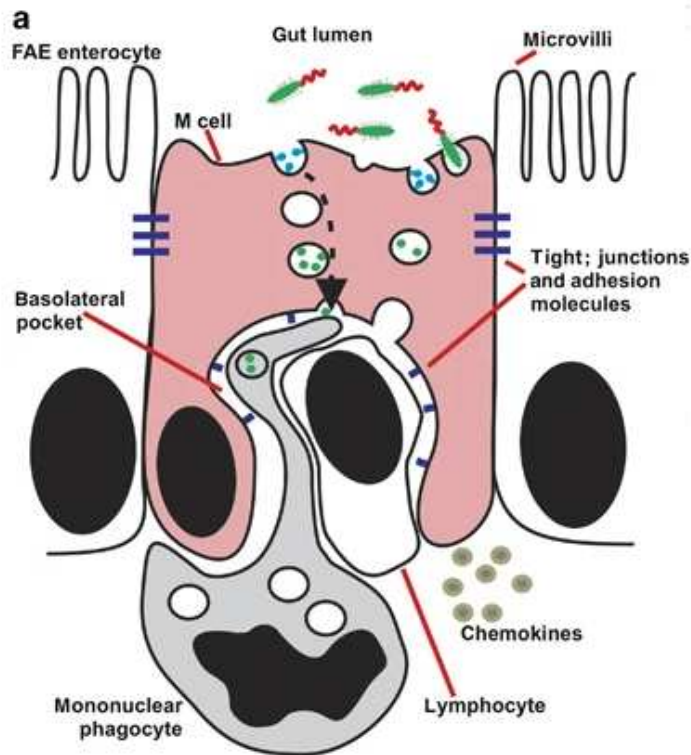


Figure 8 : Activité des cellules M. (Selon Mabbott et al, 2013) Les cellules M sont dépourvues de microvillosités, contrairement aux entérocytes. Elles sont également capables de produire des jonctions intercellulaires avec les entérocytes. Elles sont capables d'endocytter les molécules contenues dans la lumière intestinale (en vert), qui peuvent être d'origine bactérienne par exemple. Les molécules sont transportées jusqu'à la poche basolatérale, caractéristique des cellules M. Au sein de la poche basolatérale, les prolongements des cellules dendritiques, vont capter les molécules. Les cellules dendritiques vont ensuite activer ou non les lymphocytes B et T environnants, en fonction de la nature de l'antigène (inflammation ou tolérance).

Il existe des différences de population et de morphologie entre le côlon et l'intestin grêle (figure 9). En effet, les cryptes de l'intestin grêle sont plus irrégulières et plus longues, tandis que le côlon qui contient des cryptes plus régulières. Les cellules de Paneth sont présentes dans l'intestin grêle, mais absentes du côlon chez l'Homme. Les cellules de Gobelet et les cellules entéro-endocrines sont en nombre plus important dans le côlon par rapport à l'intestin grêle. La plupart de l'organisation de la réponse immunitaire s'effectue dans le côlon et l'iléon, elle est en revanche, très peu représentée

dans le reste de l'intestin grêle. La description des différences entre les deux épithéliums est importante pour comprendre les mécanismes des deux intestins (figure 9)(72).

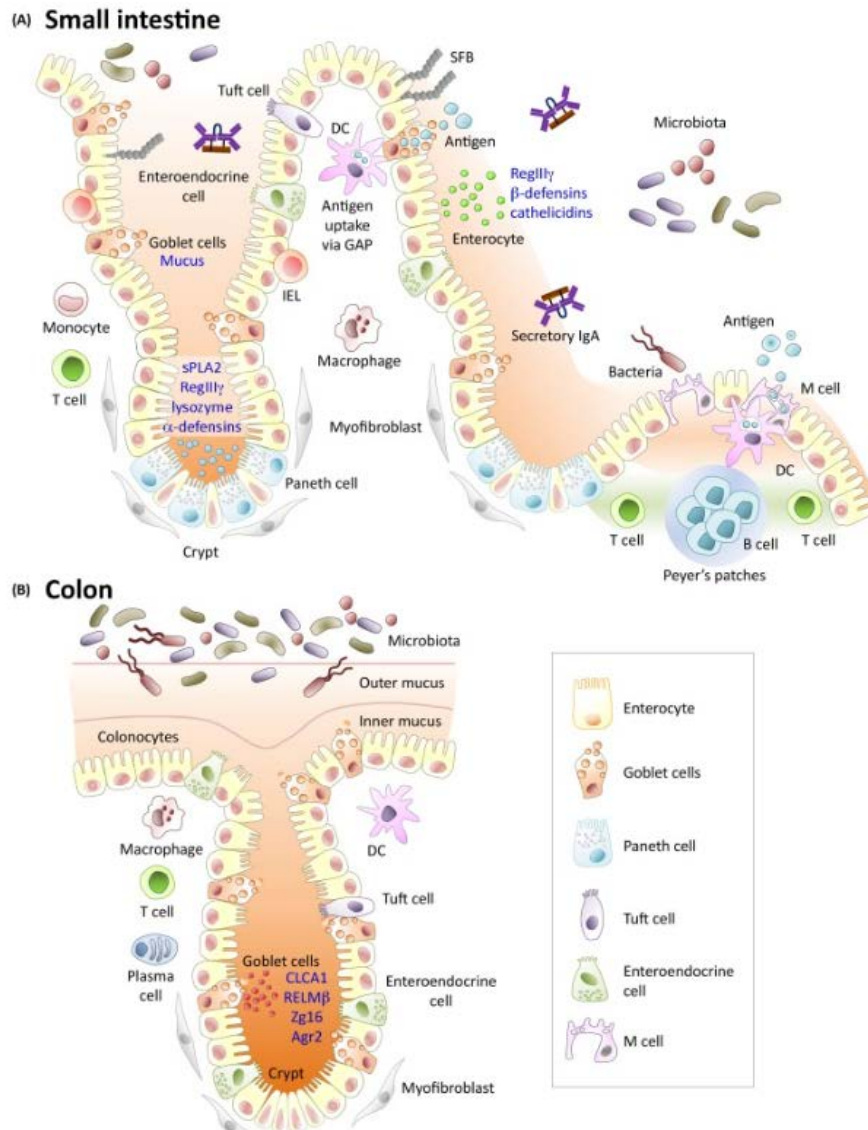


Figure 9 : Composition de l'épithélium de l'intestin grêle et le côlon. (Selon Allaire *et al*, 2018) **(A)** L'épithélium de l'intestin grêle est représenté majoritairement par les entérocytes. Les cellules Tuft situées en haut des cryptes contrôlent les invasions parasitaires. Les cellules de Gobelet sont dispersées autour des cryptes pour former une couche de mucus protectrice suffisante pour limiter le contact avec les micro-organismes. Les cellules entéro-endocrines sont représentées en faible quantité autour des cryptes. Les IgA permettent la neutralisation des agents bactériens, puis éliminés par le flux intestinal. La fonction immunitaire est assurée par des monocytes, les lymphocytes T et les cellules dendritiques circulant dans la *lamina propria*. D'autres organes lymphoïdes intestinaux assurent la fonction immunitaire, avec la présence des follicules immunitaires situés sous les dômes épithéliaux : les PdPs. Les cellules M font le lien entre la lumière intestinale et les PdPs. **(B)** L'épithélium du côlon est représenté majoritairement par les colonocytes. Il est caractérisé par des cryptes moyennes et régulières. Les cellules de Gobelets sont plus fortement représentées et forment une épaisse couche de mucus protectrice, limitant les interactions avec le microbiote intestinal dense et très abondant. Les cellules entéro-endocrines se trouvent le long des cryptes. Elles permettent d'assurer la fonction hormonale extra-intestinale.

1.2.6) Organisation de l'immunité autour de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est la première barrière contre l'invasion des pathogènes, elle peut également répondre rapidement contre l'invasion de ces pathogènes (réponse innée). Cependant, lorsque l'invasion perdure dans le temps, l'intestin doit s'organiser pour assurer une réponse immunitaire plus efficace et adaptative. Dans l'intestin, les cellules immunitaires sont regroupées à l'intérieur de follicules lymphoïdes appelés « gut-associated lymphoid tissues » (GALTs), situées dans la sous-muqueuse intestinale. Les GALTs sont des follicules immunitaires associés à l'épithélium intestinal. Dans les GALTs, sont retrouvés les PdPs, localisés dans l'iléon, et les follicules lymphoïdes isolés se situent quant à eux dans le côlon (figure 10).

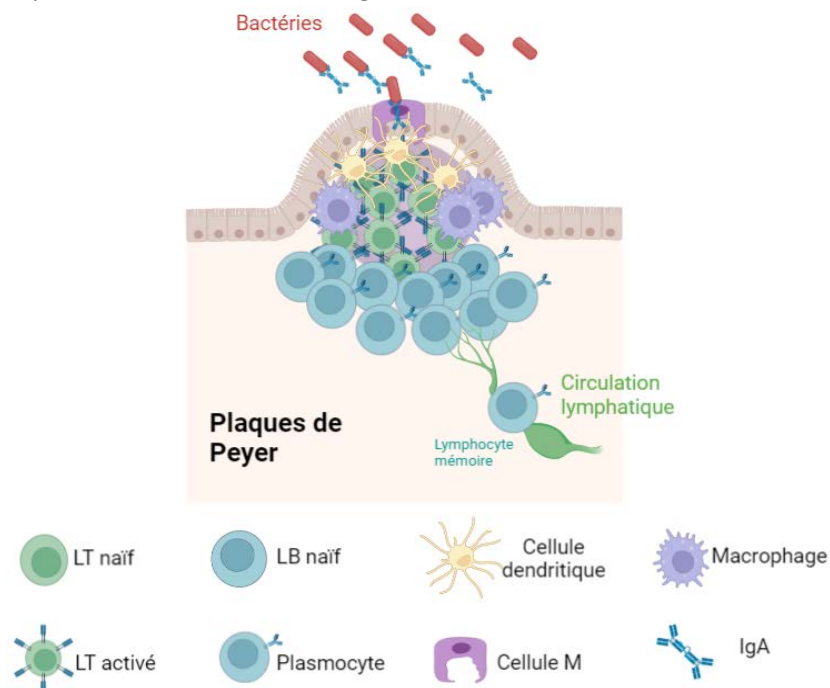


Figure 10 : Organisation des Plaques de Peyer. Les PdPs sont les organes lymphoïdes principaux de l'intestin. Elles contiennent plusieurs follicules de LBs associés aux LThs, des cellules dendritiques reliées aux cellules M et des macrophages. Les LB activées sécrètent des IgA qui contiennent deux sites de reconnaissance antigéniques, permettant le contrôle du microbiote intestinal. Les IgA peuvent également être absorbées dans les cellules M par transcytose. L'antigène est ensuite présenté aux cellules dendritiques, aux macrophages. Pour finir, les cellules dendritiques activent les LBs et aux LThs reconnaissant l'antigène. La veille immunologique est assurée par les LBs différenciés en plasmocytes mémoires qui migrent par la circulation lymphatique (Figure créée à partir de Biorender).

Les PdPs représentent le plus gros follicule immunitaire de l'intestin. Le développement des PdPs débute dans l'embryon (73). Les PdPs deviennent matures après la naissance, par contact avec les bactéries commensales (74). Elles sont composées de cellules dendritiques, de macrophages, de LThs et LBs. Les LThs sont situés au centre, tandis que les LB se trouvent à l'extérieur du follicule (Figure 10). Les cellules dendritiques et les macrophages captent les antigènes présentés par les cellules M. Ces cellules immunitaires présentent ensuite l'antigène aux LThs, ce qui induit une activation des LThs. Les LThs captent et activent ensuite les LBs circulants. Les LBs sécrètent des IgA, qui se fixent sur les antigènes des agents pathogènes, ce qui empêche ainsi de se lier aux cellules de l'épithélium intestinal et l'invasion. Elles peuvent aussi être internalisées (fixées à l'antigène) par les cellules M pour faciliter l'échantillonnage des antigènes et moduler la réponse immunitaire (75,76). La surveillance immunitaire à long terme s'effectue par le passage des LBs mémoires différenciés, en plasmocytes sécrétant d'IgA dans la circulation lymphatique, jusqu'à réactivation après reconnaissance du même antigène. En fonction de la nature de l'antigène, un phénomène de tolérance peut être transmis, ce qui induit en finalité une inhibition de l'inflammation. Les composants alimentaires ou les antigènes produits par certaines bactéries commensales peuvent induire la stimulation de lymphocytes T régulateurs (LTreg). La prolifération des LTreg survient après la rencontre d'un antigène qui n'est pas un danger pour l'intestin. Les neutrophiles et les macrophages spécialisés dans la réponse immunitaire innée sont désactivés, la prolifération des LThs et LBs est également inhibée. Ces événements conduisent à une diminution de l'inflammation intestinale et systémique. Au contraire, la présentation d'antigènes provenant d'agents pathogènes est reconnue comme un danger pour l'intestin, ce qui active les acteurs de l'immunité innée et les lymphocytes, provoquant une réponse inflammatoire, permettant par la suite de lutter contre le danger induit par l'agent pathogène. Les PdPs sont très importantes pour assurer la réponse immunitaire innée et surtout adaptative, pour contrôler les

micro-organismes situés dans la lumière intestinale et la réponse inflammatoire. Les PdPs sont le centre contrôle de l'homéostasie immunitaire intestinale et permettent l'induction de la tolérance ou de l'inflammation intestinale (figure 10). Le côlon ne possède pas de PdPs mais une organisation très similaire (Follicules lymphoïdes isolés) assurant la continuité de la veille immunitaire dans l'intestin (77).

De nombreux médiateurs chimiques (cytokines et chimiokines) jouent un rôle de messager entre les GALTs et l'épithélium intestinal. Les cytokines et chimiokines orientent une réponse inflammatoire spécifique en fonction de la nature de l'agression intestinale (78).

1.2.7) Les moyens d'études de l'épithélium intestinal : la relation hôte/micro-organismes

L'intestin est un organe complexe, cependant, il existe de nombreux moyens d'études pour caractériser les mécanismes mis en jeu dans l'épithélium intestinal, plus particulièrement dans les relations entre l'hôte et les micro-organismes. Le moyen d'étude le plus fiable est l'étude clinique chez l'Homme. Dans un contexte d'étude des relations entre l'hôte et les micro-organismes intestinaux, pour des conditions éthiques et de sécurité, les études cliniques chez l'Homme sont très contrôlées et rares. Au préalable, les études cliniques nécessitent une validation de modèles d'études *in vivo* et *in vitro*, avant d'être utilisées.

1.2.7.1) Modèles *in vivo*

Le second modèle d'étude le plus fiable est le modèle animal. Plusieurs espèces animales ont permis d'accroître les connaissances sur les relations entre l'hôte et les micro-organismes. En raison de leurs faibles coûts dans la recherche, le rat et la souris sont les modèles d'études les plus fréquemment utilisés. Si le rat et la souris présentent une organisation générale similaire à l'Homme,

de nombreuses différences comportementales, anatomiques, physiologiques et métaboliques sont à noter (79,80).

Le modèle animal de prédilection dans les interactions hôte micro-organisme dans l'intestin est le porc. La physiologie du tube digestif chez le porc ressemble à celle retrouvée chez l'Homme, en termes de transit et d'efficacité digestive (81). Cependant, le modèle de porc nécessite de nombreuses qualifications du personnel technique, le coût des modèles est élevé et le temps de reproduction est relativement long.

Les modèles *in vivo* sont de bons modèles et restent indispensables pour mettre en place les études cliniques chez l'Homme. Néanmoins, en 2021, l'INSERM a signé une charte de transparence, s'engageant à réduire et remplacer les modèles animaux, pour des raisons éthiques. C'est pour cette raison que de nouveaux moyens d'études *in vitro* doivent être développés.

1.2.7.2) Modèles *in vitro*

Pour remplacer les modèles animaux, de nombreux modèles *in vitro* ont émergé ces dernières années. Les modèles *in vitro* ont déjà montré de fortes capacités dans le domaine d'études de la relation entre l'hôte et les micro-organismes. En plus de réduire les problèmes éthiques, les modèles *in vitro* sont très utiles pour étudier les mécanismes mis en jeu dans l'intestin, difficiles à contrôler dans les modèles *in vivo* (82). Ces modèles d'études engagent un faible coût pour la recherche. Ce sont pour ces raisons qu'ils sont donc très utiles pour les études en recherche fondamentale.

1.2.7.2.1) Les lignées cellulaires primaires

Les lignées cellulaires primaires sont issues de l'épithélium intestinal viable, à partir de tissus humains. Elles représentent au mieux l'épithélium intestinal viable *in vitro*, car elles conservent des caractéristiques physiologiques et métaboliques viables. Cependant, le protocole d'isolement des

cellules à partir d'un épithélium humain est fastidieux. Une étude de 2011, a permis d'isoler et de maintenir l'épithélium de l'intestin grêle humain *in vitro*. Toutefois, cette méthode nécessite l'apport de nombreux facteurs de croissance et une interaction entre les myofibroblastes sous-épithéliaux et les cellules épithéliales intestinales pour maintenir la culture des cellules intestinales viables (83). Une autre lignée de culture primaire a été établie à partir d'une biopsie de l'intestin humain. Cette méthode a permis d'isoler les cellules épithéliales intestinales ainsi que les cellules contenues dans la *lamina propria*, puis de les cultiver (84). La mise en place de culture primaire intestinale est peu reproductible et le taux de viabilité cellulaire est faible. De plus, l'étude des cellules issues d'un tissu humain viable pose également des problèmes éthiques.

1.2.7.2.2) Les lignées cellulaires immortalisées

Les lignées de cellules immortalisées sont les modèles *in vitro* les plus utilisés depuis plusieurs années, pour étudier les organes humains. Elles remplacent les lignées de cultures primaires car elles offrent plusieurs avantages. En plus de leurs facilités d'utilisation, le rapport coût-efficacité est très bon et l'approvisionnement en matériel est illimité. De plus, ces lignées contournent les problèmes éthiques liés à l'utilisation de tissus d'humains (85). Parmi les lignées cellulaires immortalisées étudiées, les cellules Caco-2 constituent le modèle cellulaire le plus utilisé depuis les vingt dernières années (82,86). Cette lignée cellulaire est dérivée d'un adénocarcinome colorectal humain (87). Les Caco-2 forment tout d'abord une monocouche confluyente, puis se différencient, lorsqu'elles sont en culture. Elles sont polarisées et connectées les unes aux autres par des jonctions serrées. Elles présentent les caractéristiques fonctionnelles et entérocytaires, par l'expression de plusieurs enzymes et récepteurs (88).

Le modèle de culture de Caco-2 a été ensuite amélioré par l'ajout de la lignée HT29-MTX, représentant les cellules de Gobelet, productrice de mucus, pour former une co-culture (89). L'ajout

de cette lignée apporte une nouvelle fonctionnalité au modèle intestinal *in vitro*, générant des résultats expérimentaux plus prévisibles dans l'étude de la perméabilité intestinale.

Une étude de 2013, menée par l'équipe de Araújo, définit la mise en place d'un modèle tri-cellulaire. L'ajout de la lignée Raji-B, dérivée de LB, par la sécrétion de médiateurs, permet la différenciation des Caco-2 en cellules M (90). Le modèle tri-cellulaire Caco-2/HT29-MTX/cellules M a permis l'amélioration de la physiologie intestinale du modèle, par complexification.

La culture de ce modèle tri-cellulaire peut être effectuée sur les inserts Transwell® (Figure 11)(82). Ce système imite la configuration de barrière intestinale. Il permet également l'étude de la relation entre l'hôte et les micro-organismes (91).

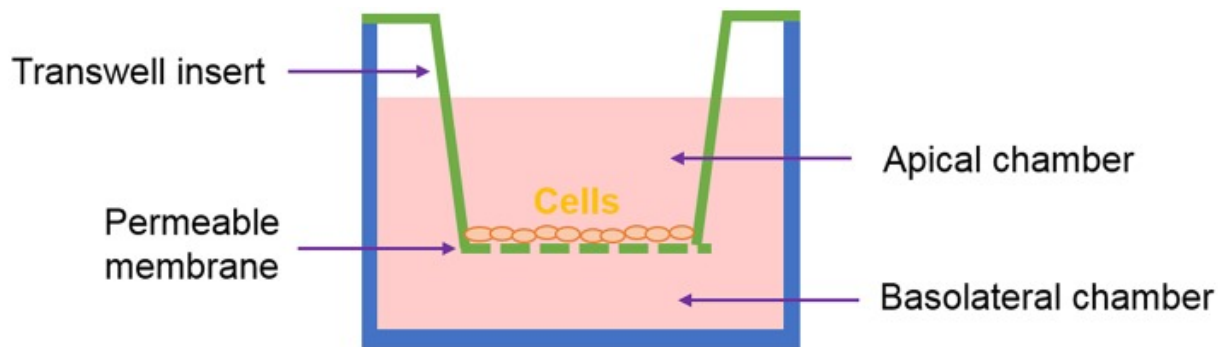


Figure 11 : Représentation du système Transwell®. (Selon Costa et al, 2019) Les lignées cellulaires sont disposées sur un insert perméable. La confluence cellulaire sépare ensuite la chambre apicale, représentant la lumière intestinale, et la chambre basolatérale, représentant la *lamina propria*.

En perspective, d'autres lignées cellulaires dérivées de types cellulaires différents pourraient permettre l'ajout de fonctions supplémentaires au modèle intestinal *in vitro*. La lignée cellulaire immortalisée NCI-H716 représentant la fonction des cellules entéro-endocrine, ou la lignée THP-1 représentant la fonction immunitaire des macrophages, pourraient être ajoutées pour optimiser ce modèle (92,93).

1.2.7.2.3) Le système « Gut-on-a-chip »

Les techniques de cultures cellulaires, dites classiques, ne représentent pas les conditions environnementales retrouvées au sein de l'intestin. En effet, il existe un gradient d'oxygène dans l'intestin exposant l'épithélium à une concentration d'oxygène plus élevée au niveau du pôle basal et presque inexistant dans la lumière intestinale. La plupart des organismes vivants se développent donc dans des conditions d'hypoxie dans l'intestin. Ces micro-organismes sont également soumis au péristaltisme intestinal, non représenté dans les conditions de culture cellulaire classiques statiques. Pour étudier les interactions entre l'hôte et les micro-organismes anaérobies, le système « Organ-on-a-chip » a été développé.

Il existe une multitude de systèmes « Organ-on-a-chip » développés ces dernières années (94), Plus précisément pour caractériser un environnement intestinal plus réaliste, le système « Gut-on-a-chip » a été mis en place. Le corps de la puce intègre de nombreux composants comme des canaux, des chambres, des capteurs, des électrodes ou des valves. Les puces sont perméables aux gaz, ce qui permet de faciliter la diffusion de l'O₂ et du CO₂. En premier lieu, les cellules sontensemencées dans les canaux, dans des conditions statiques pour faciliter leur adhésion, pendant leur développement (94). Tout comme le système Transwell®, le système « Gut-on-a-chip » comprend une chambre apicale représentant la lumière intestinale, contenant les cellules épithéliales et les micro-organismes et une chambre basale pouvant contenir des cellules endothéliales physiologiquement contenues dans la *lamina propria*. Là aussi, le but est d'étudier la fonction principale de l'intestin : la perméabilité intestinale (95). Au cours de l'expérimentation, les micro-organismes anaérobies stricts sont injectés dans la chambre apicale et le système de pompe, pour simuler le péristaltisme, est mis en place. Grâce à un système de perméabilité des gaz, le taux d'oxygène diminue de la chambre basale (contenant les cellules) jusqu'à la chambre apicale (contenant les micro-organismes), en hypoxie (96).

L'intestin est composé de cryptes et de villosités qui lui confèrent une structure en 3D. Certains systèmes « Gut-on-a-chip », peuvent représenter une morphologie en 3D de l'épithélium intestinal. En 2011, des microstructures 3D, représentant les cryptes et villosités, en respectant la densité retrouvée dans l'intestin, ont été fabriqués à partir d'un réseau d'hydrogel (97).

En comparaison des modèles cellulaires *in vitro* classique, Le système « Gut-on-a-chip » ajoute de nouvelles fonctions environnementales : un flux mécanique, l'induction de l'hypoxie dans la chambre apicale, et une structure tridimensionnelle, indispensables pour étudier les relations entre l'hôte et les micro-organismes.

La plupart des lignées utilisées dans les cultures de cellules *in vitro* sont des lignées immortalisées. Or, ces lignées confèrent de nombreuses limitations, elles ont été modifiées génétiquement par rapport aux cellules saines. Le métabolisme étudié dans les cultures *in vitro* n'est donc pas exactement similaire au métabolisme des cellules retrouvées dans l'épithélium intestinal humain sain. De plus, même si les modèles cellulaires développés comptent désormais plusieurs lignées, la totalité des types de cellules intestinales n'est pas représentée (82).

1.2.7.2.4) Les organoïdes

Les organoïdes ont émergé après les systèmes « Organs-on-a-chip ». Ils sont uniques en leur genre, car ils permettent de reproduire des systèmes de culture en 3D auto-organisés. Les organoïdes ressemblent fortement aux organes humains réels. La caractéristique commune à tous les organoïdes est qu'ils sont issus de cellules souches, imitant la régénération d'organes *in vitro* (98,99). Dans l'intestin, les cellules souches intestinales exprimant le marqueur Lgr5 s'auto-renouvellent constamment au fond des cryptes, pour maintenir un renouvellement de l'épithélium intestinal. A partir des cryptes intestinales d'un patient, la croissance des cellules souches intestinales conduit à la

formation de mini-intestins *in vitro*, avec des fonctionnalités conservées. Cette technique est applicable à une multitude de tissus digestifs et pour beaucoup d'espèces animales (100). Le premier moyen de générer des organoïdes humains est l'isolement des cryptes intestinales contenant des cellules souches adultes humaines, à partir de donneurs. Le deuxième moyen est l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines ou à partir de cellules souches pluripotentes (101). Les cultures sont initiées dans le matrigel pour fixer les organoïdes. Dans un premier temps, les cultures produisent des structures tridimensionnelles appelées sphéroïdes, le pôle apical est alors tourné vers la lumière intestinale et le pôle basal est au contact du matrigel. Les structures évoluent en entéroïdes si les cryptes proviennent de l'intestin grêle, ou en colonoïdes si les cryptes proviennent du côlon (102). Les cellules de Paneth, les cellules entéro-endocrines, les entérocytes et les cellules en Gobelet ont été identifiées dans les entéroïdes, à des proportions équivalentes à celles retrouvées dans un épithélium intestinal (99).

Des études portées sur l'interaction entre l'hôte et les micro-organismes démontrent que les protéines de certaines bactéries induisent des modifications du métabolisme, une destruction des jonctions serrées et une diminution de la perméabilité intestinale dans les entéroïdes (102,103). Néanmoins, la surface apicale de l'épithélium est située à l'intérieur des organoïdes, ce qui limite les études des interactions avec les bactéries du microbiote intestinal. La micro-injection est donc nécessaire pour étudier le contact avec les micro-organismes. Cette technique est fastidieuse et la lumière intestinale n'est pas dans un parfait état d'hypoxie, il est donc difficile de maintenir des co-cultures organoïdes/bactéries pendant de longues périodes (104).

Les organoïdes sont les modèles cellulaires *in vitro* les plus complets. Ils signent la limite entre les modèles *in vitro* et *in vivo*. Les données sur les organoïdes sont récentes et les protocoles pour étudier les interactions entre les organoïdes et le microbiote intestinal sont encore en cours de

conception. Les futures études sur les infections d'entéroïdes humains devraient permettre d'identifier de nouveaux mécanismes médiés par les espèces composant le microbiote intestinal. La découverte des organoïdes pourrait permettre une avancée certaine dans la recherche fondamentale et de remplacer petit à petit les études *in vivo*.

I.3) Le microbiote intestinal

I.3.1) Définition et rôle du microbiote intestinal

La barrière intestinale est au contact d'un grand nombre de micro-organismes. L'ensemble de ces micro-organismes regroupent les levures, les champignons, les virus, les archées et les bactéries. Le monde vivant est réparti selon une classification précise : Règne, domaine, phylum, classe, ordre, famille, genre et espèce. Les bactéries se séparent des autres micro-organismes au niveau du domaine. Les bactéries se retrouvent dans l'environnement, mais également au sein du corps humain, elles sont ubiquitaires et le regroupement de ces espèces bactériennes forme une composante du microbiote. Il existe différents microbiotes au sein du corps humain comprenant : le microbiote pulmonaire, le microbiote cutané, le microbiote vaginal et le microbiote intestinal. La composition des différents microbiotes varient en fonction de leurs localisations, car la physiologie des organes est différente (105–108). Le microbiote intestinal est le plus imposant et central dans le corps humain, il contient de nombreuses espèces bactériennes. C'est pour cette raison qu'il est très étudié dans le cas de santé humaine.

Il y a environ 10 fois plus de bactéries que de cellules au sein de l'intestin, soit entre 10^{12} et 10^{14} bactéries (109). Le microbiote intestinal est considéré comme un organe à part entière, car il est responsable de nombreux remodelages métaboliques et physiologiques au sein de l'intestin. Chez l'Homme, la répartition des espèces bactériennes dans le microbiote intestinal est très diverse entre

les individus. Les phyla retrouvés majoritairement dans le microbiote intestinal, sont les Bacillota (60 à 75%), les Bacteroidota, (10 à 40%), les Actinomycetota (3%), Pseudomonadota (1 à 2%). Les phyla Fusobacteriota et Verrucomicrobiota sont représentés de manière peu abondante (inférieur ou égal à 1%)(figure 12)(110).

Les Bacillota (anciennement Firmicutes) comprennent majoritairement des bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif. Ils sont principalement représentés par les genres *Bacillus*, *Enterococcus*, *Ruminococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Clostridium*.

Les Bacteroidota (anciennement Bacteroidetes) sont composés de bacilles à Gram négatif. Les genres *Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides* et *Alistipes* sont les plus représentés (111).

Les Actinomycetota (anciennement Actinobacteria) sont des bactéries à Gram positif, filamenteuses et sont majoritairement anaérobies. Elles sont en majorité composées de *Bifidobacterium*, *Corynebacterium* (anaérobie) et *Streptomyces* (aérobie) (112).

Les Pseudomonadota (anciennement Proteobacteria) sont des bactéries à Gram négatif, aérobies, anaérobies facultatifs. Les Pseudomonadota sont connus pour comporter des espèces bactériennes avec des propriétés pathogènes. Ils sont principalement représentés par les genres *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* et *Desulfovibrio* (113).

Les Verrucomicrobiota (anciennement Verrucomicrobia) sont des bactéries à Gram négatif, contenant très peu d'espèces décrites et étudiées. L'espèce la plus étudiée dans l'intestin est *Akkermansia muciniphila* (114).

Les Fusobacteriota (anciennement Fusobacterium) sont des bactéries à Gram négatif, anaérobie stricte. Le phylum Fusobacteriota est majoritairement retrouvé dans la flore buccale, mais se retrouve également de manière moins abondante dans l'intestin. Le genre *Fusobacterium* représente essentiellement ce phylum (115).

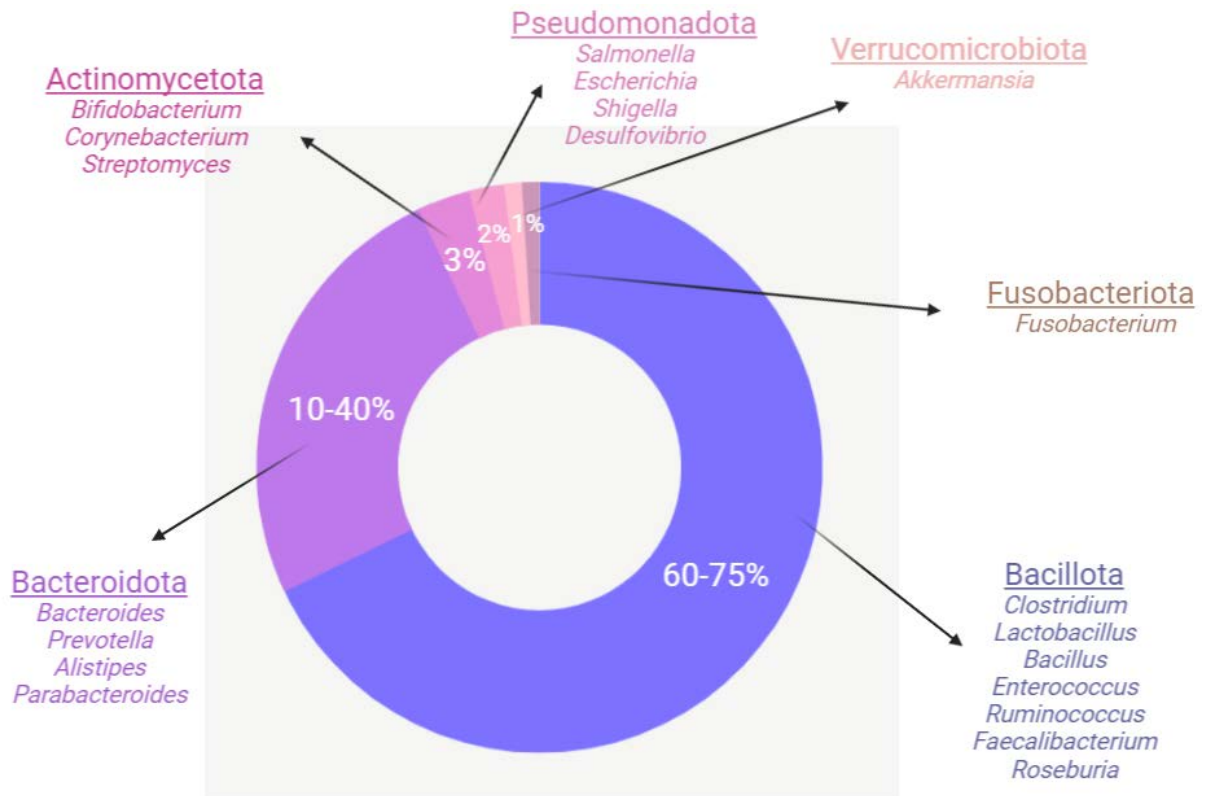


Figure 12 : Répartition des phyla majoritaires du microbiote intestinal. Le nom de chaque phylum majoritaire est souligné. Dans l'ordre, du phylum le plus représenté au moins représentés dans l'intestin : Bacillota, Bacteroidota, Actinomycetota, Pseudomonadota, Verrucomicrobiota et Fusobacteriota. Les genres bactériens les plus représentés dans chaque phylum sont situés en dessous de leur phylum respectif (91) (Figure créée à partir de Biorender).

Chez un patient sain, les cellules intestinales et le microbiote évoluent sous forme de mutualisme et tirent de part et d'autre des avantages évolutifs (116). De nombreuses études actuelles montrent l'existence de 3000 espèces intestinales bactériennes (117). Ainsi, un Homme adulte abrite

environ 200 espèces bactériennes distinctes et différentes. De plus, la majorité des bactéries ne sont pas cultivables, de nombreuses espèces bactériennes restent donc à caractériser (118).

Le long de l'intestin, la population bactérienne est croissante. En effet, le pH faible responsable de l'acidité réduit considérablement la population du microbiote dans l'estomac, avec 10^3 Unité formant colonies par millilitre (UFC/mL). Dans l'intestin grêle, le pH est plus élevé du duodénum à l'iléon, permettant au microbiote de se développer de manière plus conséquente. 10^4 UFC/mL sont retrouvées dans le duodénum, 10^7 UFC/mL dans le jéjunum et l'iléon. Dans le côlon, le pH est neutre, ce qui permet à la population microbienne d'être maximale avec 10^{12} - 10^{14} UFC/mL (119). Il existe également un gradient d'oxygène qui diminue de l'estomac jusqu'au colon (120). Sachant que 99% de la flore intestinale est anaérobie et/ou aérobie, anaérobie facultative, c'est aussi pour cette raison que les bactéries intestinales se localisent majoritairement dans le côlon.

A l'état normal, l'hôte et le microbiote intestinal, ont une relation symbiotique. Les cellules intestinales apportent les nutriments nécessaires à la survie des bactéries intestinales. Les bactéries possèdent un grand panel de gènes qui leur sont propres, appelé métagénome (121). Ces gènes, absents de la génétique humaine apportent de nombreuses fonctions à l'intestin. Un microbiote intestinal équilibré maintient la capacité métabolique de l'intestin et lui fournit des nutriments spécifiques et essentiels. Il permet le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale, la protection contre les agents pathogènes, ainsi qu'un contrôle de l'inflammation intestinale, tout en contribuant au développement et à la maturation du système immunitaire (122,123). La diversité du microbiote intestinal évite la prolifération d'une espèce bactérienne en particulier qui pourrait devenir une bactérie pathogène opportuniste.

Parmi les bactéries commensales, une grande partie des pathogènes opportunistes connus dans l'intestin appartiennent au phylum Pseudomonadota. Certaines souches appartenant aux genres bactériens *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp. et *Pseudomonas* spp. colonisent naturellement l'intestin humain, avec un potentiel de pathogénicité, si leur prolifération n'est plus inhibée, qui devient importante (124,125). Une perturbation de l'équilibre et de la diversité du microbiote intestinal peut conduire à la prolifération des souches opportunistes qui ont des effets délétères chez l'hôte. Chez un patient sain, un microbiote comprenant un équilibre des espèces bactériennes, permet d'éviter les infections intestinales provoquées par des pathogènes opportunistes, qui sont inhibés, par compétition, par les autres bactéries commensales. D'autres mécanismes d'action plus directs sont possibles, grâce à la sécrétion de métabolites antibactériens, appartenant à d'autres espèces de bactéries commensales.

1.3.2) Mise en place et évolution du microbiote intestinal

La composition du microbiote intestinal n'est pas stable et varie au cours du temps (figure 13). Le microbiote intestinal est très instable dans les premières années de vie (126). L'intestin du nouveau-né n'est plus stérile (par rapport au fœtus) et contient une forte abondance de Pseudomonadota et un faible taux de Bacteroidota (127).

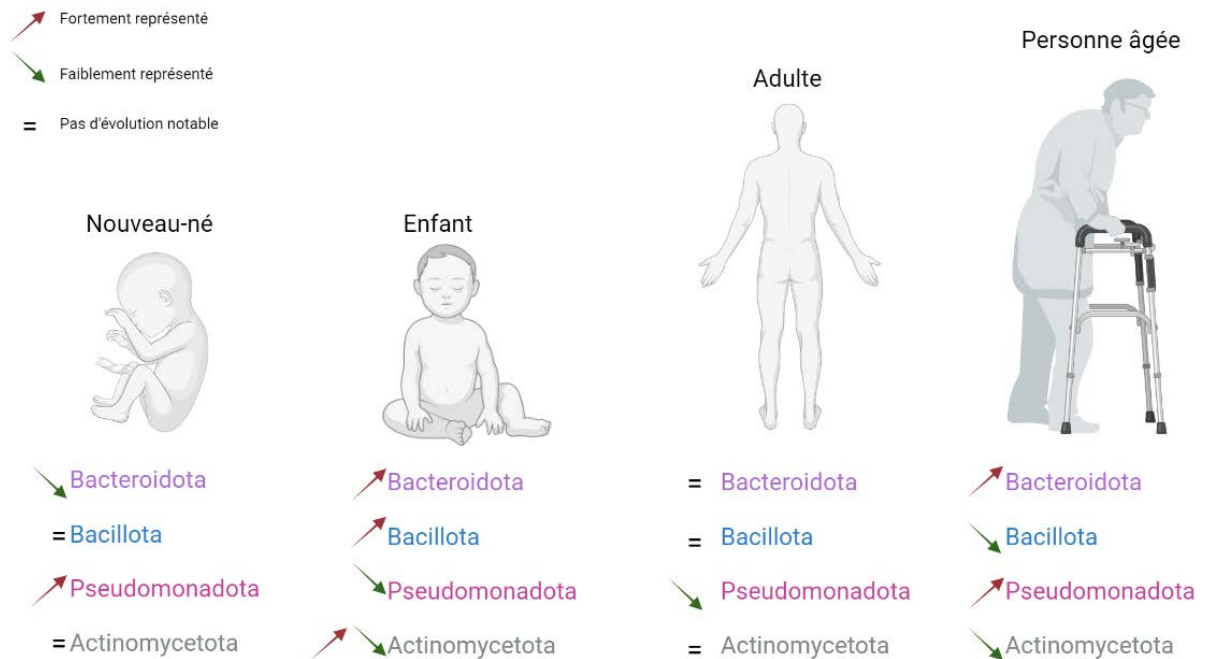


Figure 13 : Evolution des phyla majoritaires dans l'intestin en fonction de l'âge. Au stade nouveau-né, les Pseudomonadota sont fortement représentées dans l'intestin. Le transfert vertical du microbiote de la flore vaginale de la mère induit chez l'enfant une augmentation des Actinomycetota, des Bacillota et des Bacteroidota, tandis que les Pseudomonadota sont diminuées. Les Actinomycetota sont ensuite diminuées puis stabilisées, tout comme les Pseudomonadota. La flore intestinale se stabilise à l'âge adulte. Le taux de Bacteroidota et Pseudomonadota augmentent considérablement chez une personne âgée, la flore intestinale commence à se déséquilibrer au fur et à mesure des années (Figure créée à partir de Biorender).

Lors de la naissance, un transfert vertical de la mère vers le nouveau-né s'effectue. La composition du microbiote intestinal chez le nouveau-né est différente en fonction du mode d'accouchement. Un accouchement par voie basse amène une prédominance de la flore vaginale de la mère chez le nouveau-né. Une forte abondance du genre *Lactobacillus*, puis une augmentation des Bacteroidota et Bacillota est observée après la naissance (128). Le microbiote des enfants accouchés par césarienne est colonisé par les bactéries retrouvées sur la peau, pouvant contenir des bactéries potentiellement pathogènes telles que *Staphylococcus* et *Acinetobacter* (129). Des études comparatives démontrent, qu'entre 0 et 24 mois après la naissance, sous césarienne, la diversité microbienne est diminuée, avec un taux de Bacteroidota fortement diminué (5 %), et un taux de

Pseudomonadota fortement augmenté (jusqu'à 15%). La colonisation normale des phyla est alors retardée.

Chez les enfants, la variation des espèces bactériennes au cours de la croissance, est différente, selon l'origine de l'allaitement (126). Jusqu'à la puberté, le microbiote s'enrichit et se diversifie. De manière générale, les genres bactériens *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* (bactéries lactiques), *Staphylococcus* (transfert du microbiote de la peau au cours de l'allaitement) et *Enterococcus* sont transférés par allaitement. La diversité des *Staphylococcus* est ensuite fortement diminuée avec le temps tandis que les bactéries lactiques sont toujours fortement abondantes.

Après la puberté, jusqu'à l'âge adulte, une augmentation des phyla Bacteroidota et Actinomycetota est observée, puis la composition du microbiote intestinal se stabilise pendant de nombreuses années. C'est à l'âge adulte que le microbiote intestinal est le plus riche et stabilisé dans le temps (127).

La richesse globale du microbiote intestinal décline ensuite avec l'âge et de nouvelles espèces bactériennes colonisent l'intestin des personnes âgées. Les bactéries pathogènes opportunistes prennent le dessus sur les autres bactéries commensales et l'hôte devient alors plus sensible aux infections bactériennes. Les phyla Bacteroidota et Pseudomonadota augmentent à partir de 70 ans. Le déclin du ratio Bacillota/Bacteroidota est associé à une diminution de la production des métabolites bénéfiques pour l'hôte. La diminution des souches bénéfiques est associée à des défauts métaboliques, dû à la diminution du taux de métabolites bactériens (130). Ces données pourraient expliquer une partie du déclin de la santé chez une personne âgée (131).

I.3.3) Moyens d'études du microbiote intestinal

Il existe différents moyens pour étudier la composition du microbiote intestinal. Dans les premières études, la composition bactérienne du microbiote intestinal a été analysée à partir de broyats intestinaux. L'isolement et la numération des colonies des bactéries intestinales sur des milieux de culture bactériens utilisés en laboratoire ont été effectués. L'isolement a permis l'identification d'une partie des bactéries colonisant l'intestin et la numération a permis de quantifier les espèces identifiées (132). Cependant, seul 10 à 20% de la flore a pu être étudiée. La technique d'isolement des bactéries est limitée, car la majorité de la flore intestinale est anaérobie et la plupart des bactéries ne sont pas cultivables sur les milieux de cultures disponibles en laboratoire. La culture des bactéries en condition anaérobie a tout de même permis l'identification des genres *Clostridium*, *Bacteroides* et *Bifidobacterium* par exemple (122).

Le séquençage de l'ADN bactérien a révolutionné les recherches sur le microbiote intestinal. L'analyse complète du microbiote intestinal a pu être effectuée grâce au séquençage de l'ADN codant pour la sous-unité ribosomale 16S (16S rRNA) bactérien à partir de 1994 (133). La région 16S est un petit gène de 1,5 kB contenant 9 régions hypervariables permettant de discriminer les espèces bactériennes. Parmi ces 9 régions hypervariables, les régions hypervariables V3, V4, V6 et V8 sont très utilisées, car ce sont les régions qui comportent le plus de variations (figure 14) (134).

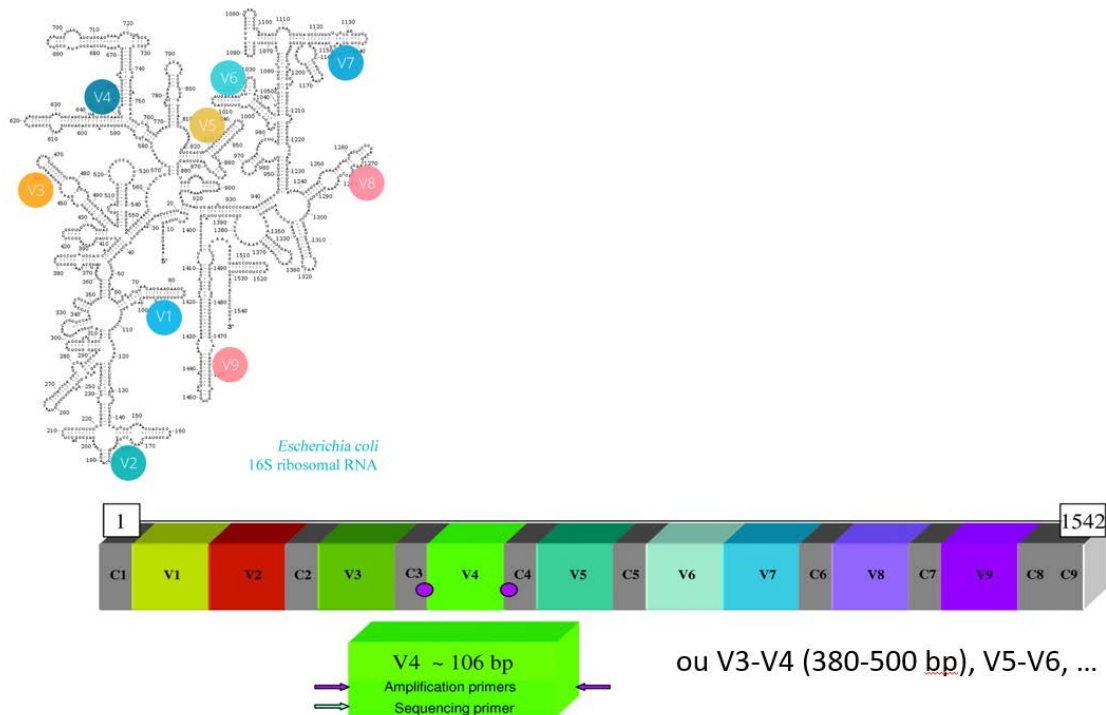


Figure 14 : Analyse du gène 16S bactérien. (Selon Untergasser et al, 2019 ; Maccaferri et al 2012) Le gène 16S est ubiquitaire chez les bactéries, il est séparé de manière séquentielle par des régions variables (V) et des régions constantes très conservées (C). Les régions constantes sont réparties de C1 à C9 tandis que les régions variables sont réparties de V1 à V9. Le séquençage des régions variables est effectué en utilisant des amorces sens et antisens (représentée par des flèches violettes) situées en amont d'une région variable, sur une région constante (représenté par les points violets) commune à tous les genres bactériens. Le séquençage des régions variables permet de discriminer les espèces bactériennes en fonction de leurs différences génétiques sur les régions hypervariables du gène 16S (spécifique de chaque genre).

En utilisant des amorces qui se fixent sur les régions constantes englobant les régions hypervariables, une analyse des genres bactériens peut être effectuée. Une différence de 3% sur l'analyse du gène 16S discrimine deux espèces (135). Cette technique a permis l'identification de 3000 espèces bactériennes intestinales (136). Depuis plusieurs années, la qualité et la quantité des analyses sont facilitées par des méthodes de séquençage en pleine évolution, telle que la technique « Next Generation Sequencing » (NGS). Ces techniques permettent l'analyse comparative des microbiotes intestinaux sur plusieurs individus comprenant des conditions différentes.

Pour évaluer les différences de composition du microbiote chez un ou plusieurs individus, différents paramètres sont mis en place. L' α -diversité désigne le nombre d'espèces bactériennes globales retrouvées au sein de l'intestin, soit le nombre de taxons représentés chez un individu. Les résultats de l' α -diversité sont représentés sous forme d'indice comme Chao-1 ou Shannon. Un indice diminué peut signifier une diminution de la richesse des taxons chez un individu et un dérèglement du microbiote intestinal chez l'hôte. La β -diversité consiste à comparer la diversité des espèces bactériennes entre deux groupes d'individus, et quantifie la similarité ou la distance entre deux microbiotes. Les résultats de la β -diversité sont représentés sous forme d'indice de dissimilarité comme Bray-Curtis. Un indice éloigné significatif entre deux groupes peut signifier que la répartition de la diversité du microbiote est induite par un ou plusieurs facteurs communs dans l'un des groupes d'individus. Cet indice peut également témoigner d'un déséquilibre du microbiote intestinal. Pour aller plus loin, pour les espèces impactées par un déséquilibre du microbiote intestinal, une analyse par séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S du microbiote est nécessaire afin d'étudier la variation des phyla, familles ou genres bactériens (137).

1.3.4) Dysbioses

1.3.4.1) Définition d'une dysbiose

Chez un patient sain, les espèces bactériennes sont en équilibre, c'est l'eubiose. Cependant, différents facteurs peuvent venir perturber cet équilibre, ce déséquilibre est appelé dysbiose. La dysbiose est un déséquilibre anormal de la composition bactérienne et de la distribution des espèces bactériennes. Ainsi, dans ce cas, certaines bactéries commensales prolifèrent au profit d'autres. Certaines de ces bactéries augmentées dans les dysbioses, correspondent à des bactéries commensales dont les effets ne sont pas connus ou des bactéries décrites comme opportunistes. Les dysbioses pourraient également favoriser l'infection de bactéries pathogènes stricts et inversement

(138,139). Les variations des phyla, famille, genres ou espèces bactériennes peuvent être communes à différents patients, dans une pathologie spécifique (140,141). Elles sont également associée à des changements d'activités métaboliques du microbiote intestinal ou de l'hôte (142). Les pathologies intestinales ou extra-intestinales sont très souvent corrélées à des dysbioses (143). A l'heure actuelle, on ignore encore comment les bactéries affectées par ces pathologies, sont liées aux autres bactéries communes de l'intestin (141). Le débat actuel porte sur le fait que la dysbiose est une cause, une conséquence ou les deux, d'une pathologie (144).

1.3.4.2) Facteurs de dysbioses

Les dysbioses peuvent être induites par différents facteurs exogènes (environnementaux) ou endogènes (figure 15) (145).

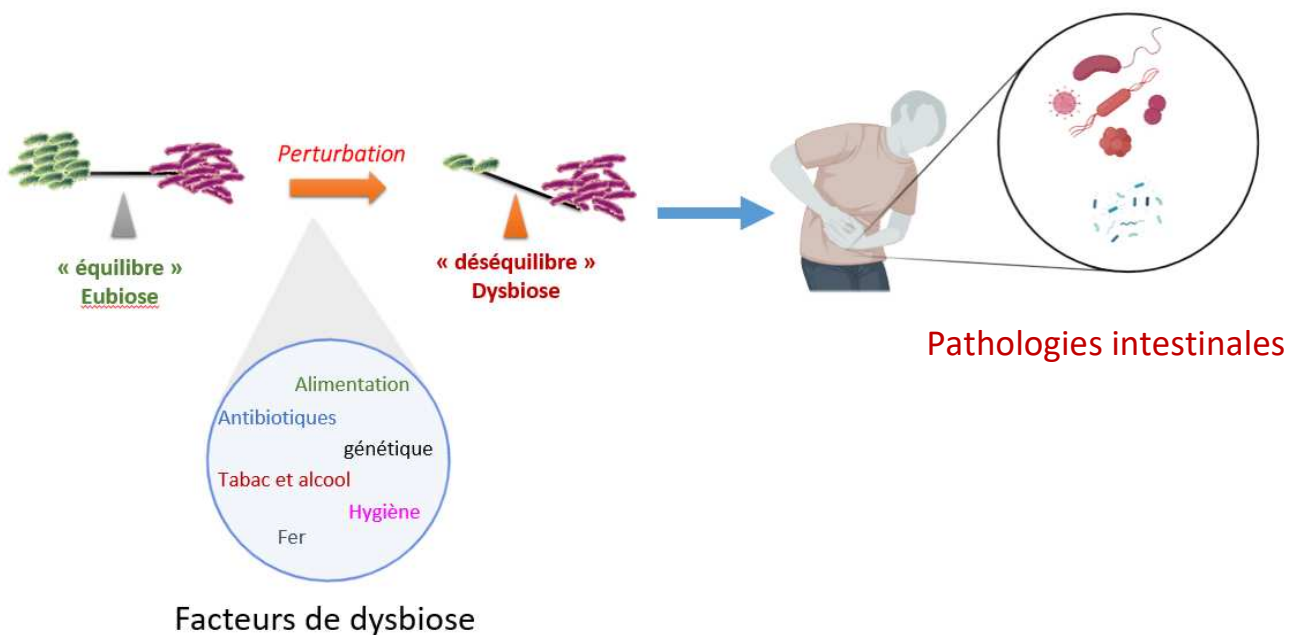


Figure 15 : Facteurs de dysbiose. L'alimentation, les antibiotiques, le tabac, l'alcool, l'hygiène ou le fer font partie des facteurs exogènes pouvant être responsables de dysbioses intestinales. Le facteur génétique est un facteur endogène (propre à chaque personne). A long terme, les dysbioses intestinales peuvent conduire à des pathologies intestinales inflammatoires, qui peuvent être caractérisées par une persistance de certaines espèces bactériennes (Figure créée à partir de Biorender).

I.3.4.2.1) La diversité génétique

La composition du microbiote intestinal dépend, dans un premier temps (dès la naissance), de facteurs génétiques. Il a été démontré qu'entre les personnes d'une même famille, le microbiote intestinal est relativement proche, comparé à des personnes non apparenté (146). Ainsi, une étude sur une cohorte de 416 jumeaux monozygotes (vrais jumeaux) et dizygotes (faux jumeaux) montre que l'abondance et la composition taxonomique sont globalement similaires chez les monozygotes, ce qui prouve que la génétique influe sur la composition bactérienne de l'intestin (147). La mutation du gène VDR (vitamine D receptor) chez certaines personnes modifie la diversité du microbiote intestinal (148). Des mutations du gène pro-inflammatoire « Nucleotide-binding oligomerization domain 2 » (NOD2) participant avec la protéine NOD1 à la lutte contre les bactéries intracellulaires ont été identifiés comme marqueur de dysbiose. A long terme, ces mutations peuvent conduire à une exacerbation de l'inflammation conduisant à une dysbiose, caractérisées par la prolifération d'*Enterobacteriaceae* (149). À plus long terme, ces mutations des gènes NOD peuvent favoriser le développement des pathologies inflammatoires comme la maladie de Crohn (CD) (150). Il existe de plus de 200 gènes cellulaires chez l'Homme, décrits dans la littérature, susceptibles d'être impliqués dans les MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin)(151). Les MICI se caractérisent par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif, due à une dérégulation du système immunitaire intestinal (152). Parmi les gènes impliqués dans les MICI, certains interviennent dans l'immunité innée et adaptative, incluant : *IL23R*, *TYK2*, *STAT3*, *IL12* et *JAK2*. Les gènes impliqués dans la clairance autophagique des bactéries intestinales, permettant d'éliminer les bactéries invasives, rentrent aussi en jeu dans certaines MICI : *IRGM*, *ATG16L1*, et *ULK1*(153).

1.3.4.2.2) Le régime alimentaire

L'alimentation, de manière générale, est un facteur de dysbiose, le microbiote est constamment modulé par le régime alimentaire. Il est décrit que le régime « High Fat Diet » (HFD), représentant le régime obésogène riche en lipides, induit une diminution de l' α -diversité et un changement de β -diversité du microbiote intestinal (154). Le régime HFD induit une diminution de *Bifidobacterium* spp. et *Prevotella* spp. et une augmentation des *Bacteroides* spp. Les *Clostridium* spp. et *Oscillobacter* spp. augmentent tandis que *Lactobacillus* spp. diminuent. En parallèle, *Desulfovibrio* spp. (Pseudomonadota) sont augmentées tandis que *Akkermansia* spp. (Verrucomicrobiota) sont diminuées (155). Le style de régime occidental (ou « Western Diet ») induit des perturbations du microbiote intestinal et des désordres métaboliques chez l'hôte, se traduisant à plus long terme par l'apparition de pathologies comme l'obésité ou le DT2 (156). Le régime Méditerranéen, composé d'une grande proportion de fibres, d'anti-oxydants et de polyphénols, protège contre les risques de pathologies cardiovasculaires, contre le stress oxydant et contre l'inflammation (157). Ce régime diminue également les dysbioses intestinales chez les patients ayant un syndrome métabolique intestinal (158). En régulant le microbiote intestinal, l'alimentation joue donc un rôle central sur la santé humaine et animale.

1.3.4.2.3) Les antibiotiques

Pour lutter contre les infections bactériennes intestinales, les antibiotiques sont très largement utilisés depuis leurs découvertes en 1928 par Alexander Fleming (159). S'ils permettent de traiter différentes infections de bactéries pathogènes, ils peuvent également cibler beaucoup d'autres espèces bactériennes commensales. Par exemple, la vancomycine diminue la diversité microbienne, plus particulièrement des Bacillota, dans les fèces (160). La combinaison d'ampicilline, gentamicine, métronidazole et néomycine induit un changement drastique de la composition du microbiote

intestinal (161). Une étude montre que le pré-traitement par les antibiotiques, comprenant la vancomycine, la streptomycine et le métronidazole chez les souris atteintes de colites, influence la capacité du microbiote à contrôler l'inflammation intestinale (162). En plus de la problématique de désorganisation du microbiote intestinal, de nombreuses résistances bactériennes commencent à apparaître. Au sein de l'intestin, les gènes de résistance aux antibiotiques sur les chromosomes bactériens, ainsi que les éléments mobiles comme les transposons, sont à leur pic d'abondance après une exposition aux antibiotiques, chez des enfants (163). Les antibiotiques peuvent également conduire à la prolifération de bactéries pathogènes dans l'intestin comme *Clostridium difficile* (164).

Les antibiotiques sont à l'origine de plusieurs problèmes. Premièrement, les dysbioses intestinales survenant après une prise d'antibiotiques engendrent un désordre métabolique, pouvant conduire à des pathologies inflammatoires chroniques à plus long terme. Le second problème se porte sur les résistances des bactéries intestinales aux antibiotiques, qui peuvent conduire à la prolifération de bactéries pathogènes opportunistes. La forte utilisation des antibiotiques par la population mondiale peut s'accompagner d'échecs thérapeutiques, contre des pathogènes intestinaux ou extra-intestinaux. L'objectif est désormais de se tourner vers d'autres stratégies de traitements, plus spécifiques, ciblant les bactéries pathogènes, sans avoir d'impact, sur les autres bactéries du microbiote intestinal.

1.3.5) Exemples de dysbioses associées à des pathologies humaines

Les dysbioses au sein de l'intestin sont corrélées avec des pathologies intestinales chroniques. Parmi les pathologies intestinales, figurent les MICI, les cancers colorectaux, le DT2 et l'obésité. Les variations des bactéries intestinales peuvent servir de biomarqueurs pour différentes pathologies intestinales (tableau 1).

Tableau 1 : Bactéries du microbiote intestinal variantes dans les pathologies intestinales chroniques

Pathologies	Bactéries augmentées	Bactéries diminuées	Références
MICI	<i>E. coli</i> <i>C. difficile</i>		(165)
		<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	(166–168)
		<i>Ruminococcaceae Collinsella</i>	(169)
		<i>Bacteroides, Bacteroides vulgatus</i>	(170) (171)
	<i>Pseudomonadota</i> <i>Actinomycetota</i>	<i>Lachnospiraceae</i> <i>Ruminococcaceae</i>	(172)
		<i>F. prausnitzii, Blautia faecis, Roseburia inulinivorans, Ruminococcus torques Clostridium lavalense</i>	(173)
	<i>Klebsiella pneumoniae Proteus mirabilis</i>		(174)
	<i>Salmonella enterica</i>		(172,175)
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Akkermansia, Oscillibacter et Coprococcus</i>	(176)
		<i>B. fragilis</i> ETBF, <i>E. coli, Enterococcus Faecalis, Streptococcus gallolyticus</i>	(177)
	<i>Salmonella</i>	(178,179) (180)	
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	(181) (182,183)	
	<i>Escherichia coli</i>	(184,185)	

Cancer colorectal	<i>Bacteroides fragilis</i> ETBF, <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> <i>Streptococcus gallolyticus</i>	<i>Faecalibacterium Blautia</i> , <i>Clostridium Bifidobacterium</i> <i>Roseburia</i>	(186)
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Porphyromonas</i>		(187)
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Porphyromonas</i> <i>asaccharolytica</i>	<i>Clostridia</i>	(188)
Obésité et Diabète de type 2	<i>Bacteroides intestinalis</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Bacteroides uniformis</i>		(189)
	<i>Bacteroidales</i> , <i>Burkholderiales</i> <i>Clostridiales</i> <i>Porphyromonadaceae</i> <i>Clostridiaceae</i> <i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	(190)
		<i>Akkermansia muciniphila</i>	(191) (192,193)
		<i>Bifidobacterium</i> , <i>Roseburia</i> spp. et <i>Eubacterium rectales</i>	(194)
	<i>Ruminococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> <i>Blautia</i>	<i>Bacteroides Bifidobacterium</i> <i>Roseburia Faecalibacterium</i> <i>Akkermansia</i>	(195)
	<i>Enterobacteriaceae</i>		(196)
	<i>F. prausnitzii</i>	(197)	

<i>B. fragilis, Clostridium leptum, Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Clostridium coccoïdes, Lactobacillus, Bifidobacterium breve Bifidobacterium bifidum</i>	(198)
---	--	-------

ETBF : Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*

F. prausnitzii : *Faecalibacterium prausnitzii*

1.3.5.1) MICI

Les MICI regroupent principalement deux pathologies, la maladie de Crohn (CD) et la rectocolite hémorragique appelée aussi colite ulcéreuse (CU). Les principaux symptômes des MICI sont des diarrhées constantes, des douleurs abdominales et les saignements périanaux (199). La principale différence entre la CD et la CU est que l'inflammation engendrée par la CD s'infiltré dans n'importe quelle partie du tube digestif, tandis que la CU se limite à la surface du côlon. L'origine des apparitions des MICI n'est pas encore élucidée, même si de nombreux indices montrent que les facteurs environnementaux, génétiques pourraient en partie être les principaux responsables (200). Cependant, le facteur génétique n'explique qu'une petite partie de l'apparition des MICI (201). Induites par différents facteurs, les dysbioses intestinales, pourraient aussi être à l'origine de l'inflammation chronique, caractéristique des MICI.

Les MICI sont associées à une augmentation de l'adhérence et l'invasion de certaines souches d'*E. coli*, de *C. difficile* ainsi que des producteurs d'H₂S, qui à forte concentration est délétère pour le métabolisme cellulaire (202) .

Au contraire, l'abondance des métabolites bactériens bénéfiques pour l'intestin est diminuée (165). L'intégrité de la perméabilité intestinale est également atteinte (203,204). La réduction de l'abondance de *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* et *Faecalibacterium prausnitzii* est également

une observation effectuée dans certaines études (166–168). Chez les patients atteints de CD, une déplétion du genre *Ruminococcaceae* et *Collinsella* est observée au niveau de l'iléon (169). Le genre *Bacteroides* est fortement diminué dans les cas de MICI, au cours des différentes phases de progression de la pathologie (170). *Bacteroides vulgatus* est diminuée dans les groupes MICI par rapport aux groupes contrôles (171). Une diminution des genres *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* est observée, tandis que Pseudomonadota et Actinomycetota sont augmentés dans les CU (172). Il est également rapporté que *F. prausnitzii*, *Blautia faecis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus torques* et *Clostridium lavalense* sont diminuées dans le cas de CD (173).

Les bactéries décrites comme pathogènes ou pathogènes opportunistes sont fortement augmentés dans les MICI. L'abondance de *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* est corrélée au degré de sévérité de la colite (174). Dans une cohorte de 600 enfants, il a été montré que les 400 atteints de CD présentaient une forte prévalence d'entérobactéries. La prolifération de la bactérie pathogène *Salmonella enterica* est également associée à l'apparition de la CD (172,175).

La perturbation intestinale entraîne également un dysfonctionnement immunitaire (figure 16).

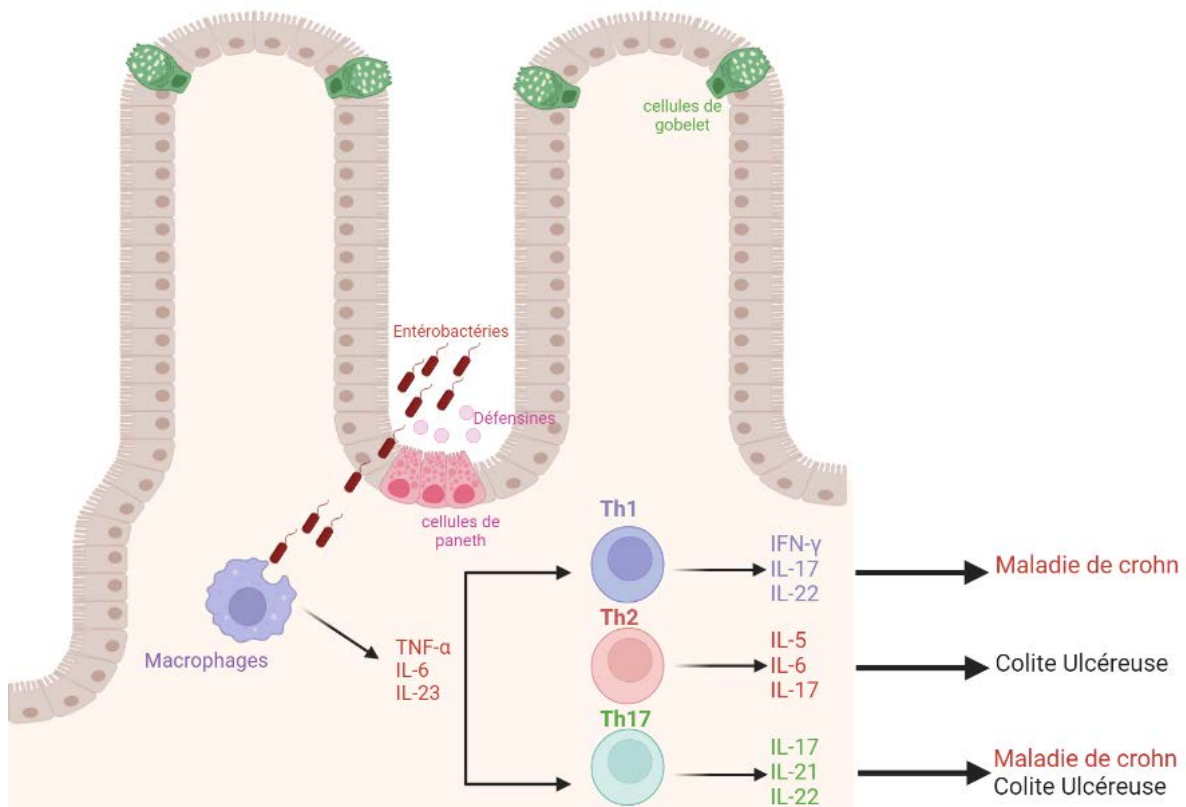


Figure 16 : Influence de la composition du microbiote intestinal sur la réponse inflammatoire et les MICI. La prolifération de certaines bactéries, comme les entérobactéries, peut conduire à leur persistance dans l'épithélium intestinal. Les bactéries pathogènes ou pathogènes opportunistes cachées du système immunitaire vont persister et induire une inflammation locale en activant les macrophages situés, sur le lieu d'infection. Une réponse inflammatoire et adaptative est ensuite mise en place : La réponse LTh1 est classiquement retrouvée dans la maladie de Crohn, la réponse LTh2 dans la colite ulcéreuse et la réponse LTh17 est caractéristique des deux pathologies. Figure créée à partir de Biorender (inspiré de Tamburini et al, 2022).

Dans les cas de CD, l'augmentation de la prolifération et la différenciation des LTh1, en réponse à un danger provenant d'un pathogène intracellulaire, sont associées à une augmentation de l'interféron- γ (IFN- γ) (cytokine intracellulaire) et de l'interleukine 2 (IL-2). Ces résultats sont corrélés à l'augmentation des infiltrats bactériens dans la *lamina propria*. Le profil des patients atteints de CU est associé à une augmentation de la réponse Th2, en réaction à un danger provenant d'un pathogène extracellulaire, avec la stimulation de l'expression de l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-13 (205). La réponse IL-23, inducteur des lymphocytes Th17 productrice d'IL-17, IL-22 et IL-23 engendre une exacerbation de la réponse pro-inflammatoire dans les CD et CU (206,207) (figure 16).

1.3.5.2) Cancer colorectal

Le cancer colorectal (CRC) est impliqué dans 900 000 décès par an dans le monde et est actuellement en plein accroissement. Les habitudes alimentaires sont fortement responsables de l'expansion du CRC. Aux Etats-Unis, plus de 52 000 personnes sont décédées du CRC en 2022 (American Cancer Society) (208). Les symptômes du CRC sont des sécrétions de sang dans les selles, des diarrhées abondantes, des douleurs et des crampes abdominales, perte de poids et une sensation de fatigue et faiblesse physique (209).

Le CRC est une pathologie intestinale associée à un dysfonctionnement inflammatoire, qui peut être régit par le microbiote intestinal. Des études montrent que le CRC est associé à l'abondance des souches ETBF (*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*), *E.coli*, *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus gallolyticus* (177). La toxine BFT produite par ETBF induit une inflammation relayant diarrhées et la formation de tumeur. En effet, la persistance de la toxine BFT induit une activation de la voie de signalisation MAPK conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17, de manière chronique, ce qui pourrait être à l'origine de la formation de tumeurs (210). D'autres études montrent l'implication du genre *Salmonella* dans le développement du CRC (178,179). En effet, les *Salmonella* sont capables d'induire la tumorigénèse par l'effecteur AvrA qui a pour action, de bloquer l'apoptose à l'intérieur de la cellule épithéliale (180). L'abondance de *Fusobacterium nucleatum* est associée avec la présence de métastases ganglionnaires du CRC (181). L'adhésine bactérienne Fad A de *Fusobacterium nucleatum*, fixe la région E-cadhérine des cellules épithéliales, et la protéine Fap 2 inhibe la prolifération des cellules Natural Killer (NK) et des lymphocytes cytotoxiques. Ces interactions protéiques participent au développement de l'inflammation et facilitent la progression du CRC (182,183). *E. coli* est capable de coloniser les muqueuses intestinales et d'induire des désordres intestinaux, provoquant le développement de CRC (185). Le sous-type B2 de *E. coli* produisent la

génotoxine « polyketide synthase » (pks) capable d'induire les CRC en effectuant des dommages sur l'ADN des cellules épithéliales (184). La variation d'autres bactéries intestinales est corrélée à la formation des CRC (tableau 1) (page 40-41).

1.3.5.3) Obésité et Diabète de type 2

L'obésité est considérée comme une maladie chronique de la nutrition. 312 millions de personnes dans le monde sont considérés comme obèses. Aux Etats-Unis, L'obésité est responsable de 300 000 décès par an (211). Elle est associée à de nombreuses comorbidités : cancers, pathologies hépatiques et cardiaques, troubles de l'humeur, hypertension et le DT2 (212). Le DT2 est une pathologie de désordre métabolique caractérisée par un phénomène d'insulinorésistance. L'insuline est une hormone qui joue le rôle de régulateur et maintient une glycémie normale dans le sang. Les symptômes du début de DT2 sont la soif extrême, la fatigue, l'étourdissement, la perte de connaissance liée à un taux de glycémie trop élevé. A long terme, le déséquilibre glycémique peut conduire à l'athérosclérose, à l'infarctus du myocarde, à des accidents vasculaires cérébraux (AVC), à des insuffisances rénales et à des lésions nerveuses accompagnées par des gangrènes. Il existe un lien fort entre l'obésité et le DT2. En effet, 90% des personnes atteintes de DT2 sont également obèses (213,214).

Des études démontrent qu'une altération du microbiote intestinal pourrait amplifier les désordres métaboliques, chez les patients obèses et diabétiques. En effet, les deux pathologies sont très souvent associées à des dysbioses intestinales. Chez les souris DT2, dont l'obésité a été induite par un régime HFD, les ordres *Bacteroidales* et *Burkholderiales*, *Clostridiales* et les familles *Porphyromonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae* étaient augmentés tandis que la famille des *Lactobacillaceae* était diminuée (190). Une autre étude montre que *Akkermansia muciniphila* était réduite chez les souris obèses qui, après ré-administration par voie orale, rétablissait les effets

métaboliques, induit par l'obésité (191). *Akkermansia muciniphila* est également réduite chez les patients atteints de DT2 (192,193). Une diminution des genres *Bifidobacterium*, *Roseburia* spp. et *Eubacterium rectales* est observée chez des souris obèses (194). Une revue résume également les différentes études menées chez l'Homme et la souris montrant la diminution des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* et *Akkermansia* dans le cas de DT2 tandis que les genres *Ruminococcus*, *Fusobacterium* et *Blautia* sont augmentés (195). Chez les patients DT2, l'augmentation de la famille *Enterobacteriaceae* a aussi été relevée (196). Les communautés bactériennes augmentées et diminuées sont relativement similaires chez les patients obèses et diabétiques.

1.4) Les entérobactéries

Les dysbioses intestinales sont dans la majorité des cas associées à une augmentation de certaines espèces de bactéries commensales dans l'intestin, corrélées à des pathologies chroniques de l'intestin. Les entérobactéries sont une famille de bacilles à Gram négatif, appartenant au phylum Pseudomonadota, commensales de l'intestin humain. Les entérobactéries ne sont pas considérées comme pathogènes lorsqu'elles colonisent naturellement et très faiblement l'intestin. Cependant, une augmentation de leur abondance dans l'intestin est corrélée à de nombreuses pathologies intestinales, ce qui fait de certains genres bactériens appartenant aux entérobactéries, des bactéries pathogènes opportunistes (215). Les entérobactéries contiennent certains genres bactériens pathogènes dont *Salmonella* (pathogène stricte). Le portage de cette bactérie dans l'intestin humain est corrélée à plusieurs pathologies intestinales chroniques (tableau 1) (144,145,158,161,175). De plus, il a été prouvé que *Salmonella* pouvait persister dans les muqueuses intestinales, à l'aide de facteurs de virulence qui lui sont propres, induisant des désordres métaboliques, pouvant conduire à une inflammation chronique de l'intestin caractérisée dans les MICI et les CRC (216).

1.4.1) *Salmonella*

Salmonella est une bactérie ubiquitaire, pathogène, pouvant provoquer des fièvres typhoïdes, gastro-entérites ou bactériémies chez l'Homme (217). Le portage de cette bactérie est majoritairement symptomatique, mais certaines personnes peuvent la porter de manière asymptomatique plusieurs mois ou de manière chronique (218–220). Le genre *Salmonella* comporte seulement deux espèces, *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica* (221). Cette dernière est divisée en six sous-espèces : *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) et *indica* (VI). Il existe 2659 sérovars identifiés chez *Salmonella enterica*. La sous-espèce *S. enterica* subsp. *enterica* compte environ 1547 sérovars différenciés par leur composition antigénique (figure 17) (222).

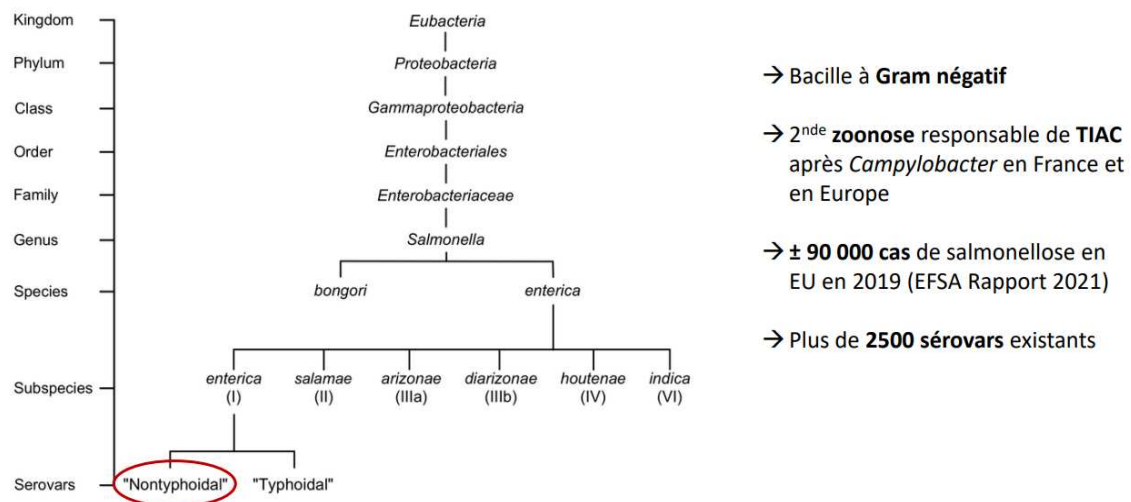


Figure 17 : Classification du genre *Salmonella*. Le genre *Salmonella* se divise en deux espèces : *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* se divise en 6 sous-espèces. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* regroupe plus de 1500 sérovars nontyphi. Ces sérovars sont les plus étudiés dans le cas des « toxi-infection alimentaires collectives » (TIAC). Les sérovars typhi sont localisés dans les pays tropicaux (195).

Les spécificités d'hôtes, ainsi que les différents symptômes engendrés, dépendent du sérovar rencontré. *Salmonella* est capable d'infecter un large éventail d'hôtes. Le principal réservoir de *Salmonella* est animal et de manière moins importante l'Homme (223). L'infection à *Salmonella* est une zoonose qui peut être transmise à l'Homme tout au long de la chaîne alimentaire, principalement

par le biais d'un large éventail d'aliments, contaminés (ex : œufs, viande, saucisson, etc.), d'origine animale. L'incidence annuelle en France a été estimée à 307 cas pour 100 000 habitants (224).

Selon l'Anses : « Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) correspondent à l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, d'origine alimentaire ». *Salmonella* est responsable de la salmonellose, deuxième cause d'infection humaine d'origine alimentaire en Europe après *Campylobacter* (221,225). En 2019, près de 90 000 cas de salmonellose ont été signalés en Union Européenne, soit un taux de notification de 20 cas pour 100 000 habitants (221).

1.4.1.1) virulence

Salmonella est une bactérie extracellulaire, intracellulaire facultative. Au cours de toxi-infection alimentaire, la bactérie se retrouve dans la lumière intestinale (226). *Salmonella* traverse ensuite le mucus sécrété par la barrière intestinale. Elle effectue le phénomène de translocation intestinale, c'est-à-dire le passage de la lumière intestinale vers la *lamina propria*, puis rejoint les différents organes où elle pourra ensuite se disséminer dans l'organisme, évoluant dans de rares cas en bactériémie (227). Le phénomène de translocation regroupe l'adhésion, l'invasion et la dissémination de la bactérie. Ces systèmes sont retrouvés chez d'autres entérobactéries comme *E. coli* spp. ou *Yersinia* spp. Les principales étapes d'adhésion et d'invasion sont résumées sur la figure 18.

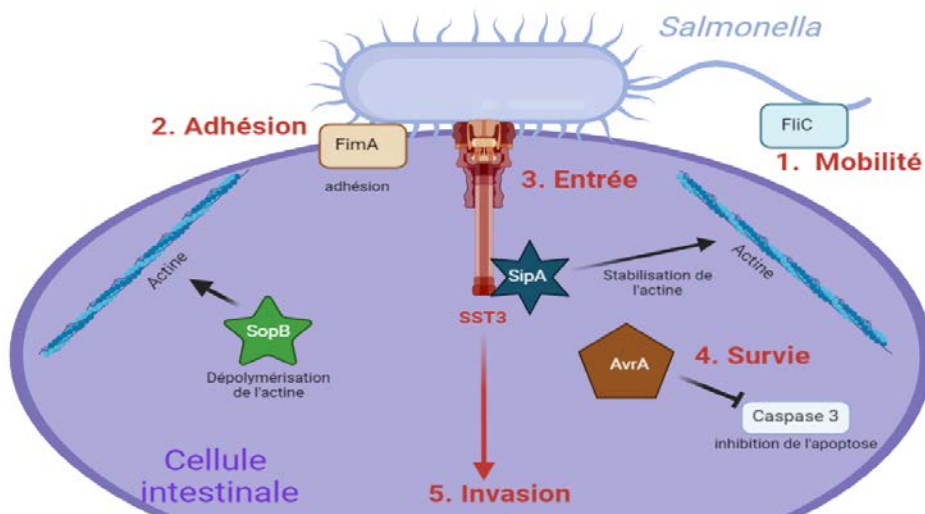


Figure 18 : Invasion des cellules intestinales par *Salmonella*. 1) La mobilité de *Salmonella* est assurée par les flagelles, formées par les protéines FliC. 2) L'adhésion aux cellules est assurée par les Fimbriae, FimA représente un des composants des fimbriae. 3) L'entrée de *Salmonella* est assurée par Le SST3 représenté en rouge sous forme de seringue, qui permet la sécrétion de différents effecteurs. SopB permet la dépolymérisation de l'actine et l'invagination de la membrane cellulaire. SipA permet la stabilisation de l'actine 4) La survie intracellulaire de *Salmonella* est assurée par des effecteurs tels que AvrA, qui empêche l'apoptose cellulaire en inhibant la caspase 3, pour maintenir la cellule viable et continuer le processus permettant 5) l'invasion de la cellule intestinale par *Salmonella* (Figure créée à partir de Biorender).

1.4.1.1.1) L'adhésion

1) Les flagelles

Au sein de la lumière intestinale, la mobilité de *Salmonella* est assurée par les flagelles. Les flagelles sont composés de sous-unité protéique. Ils sont constitués d'un long filament, ainsi que d'une base reliée à la membrane bactérienne (228). La flagelline est l'élément principal du flagelle composée par deux protéines distinctes, exprimées de manière alternative : FliC et FljB (229). FliC est présente dans les deux espèces de *Salmonella* et FljB est spécifique des sérovars de *S. enterica*. Le gène *fljA* est co-transcrit avec le gène *fljB* et la protéine FljA inhibe la transcription du gène *fliC* (229). La flagelline est alors principalement constituée par la protéine FljB. Ainsi, en fonction des conditions

environnementales, FliC ou FljB sont exprimées. Les flagelles assurent la mobilité de *Salmonella* permettant la rencontre avec les cellules intestinales (figure 19).

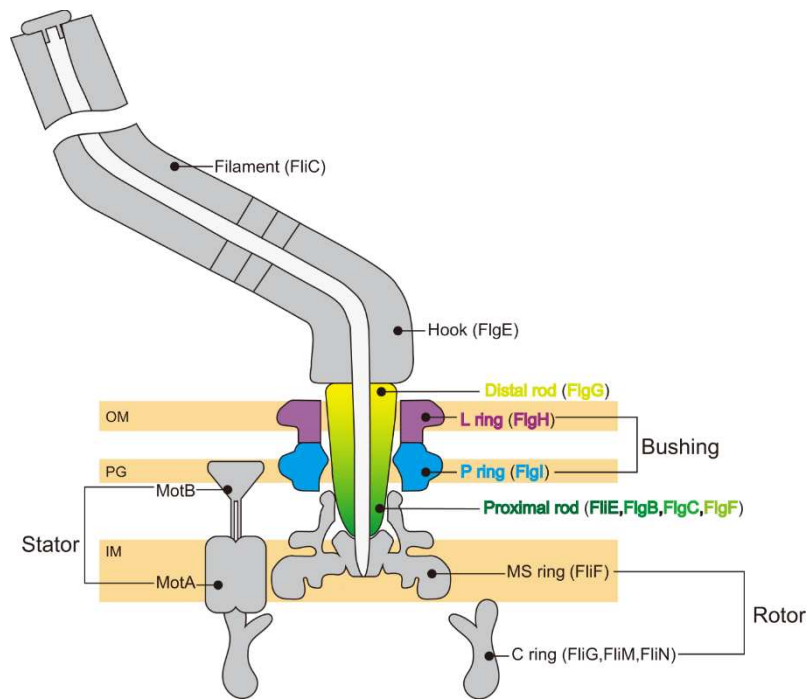


Figure 19 : Schéma d'un flagelle de *Salmonella*. (Selon Yamahuchi et al, 2021) Le filament du flagelle de *Salmonella* est composé principalement par la protéine FliC (flagelline). Le crochet avant la base du flagelle est composé par la protéine FlgE. Les protéines FlgG, FlgH et FlgI constituent la base du flagelle implanté dans la membrane externe (OM) et la couche de peptidoglycane (PG). FlgE, FlgB, FlgC et FlgG forment une tige reliant la base jusqu'à la membrane interne (MI). Le complexe MotA/MotB forme le stator et agit comme une pompe à influx H^+ , permettant la rotation du flagelle à une grande vitesse. FlgI, FlgG, FlgH et FlgI forment le rotor, également nécessaire à la mobilité. Le stator et le rotor sont ancrés dans la membrane interne de la bactérie.

2) Les fimbriae

Lorsque *Salmonella* rencontre les cellules intestinales, elle va se fixer à des sites cellulaires spécifiques, c'est l'étape d'adhésion. L'adhésion est l'attachement de la bactérie à l'épithélium, grâce à des facteurs d'adhérence comme les fimbriae de type 1 et des adhésines. Ce cluster codant pour les fimbriae de type 1 regroupe 10 gènes (*fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimH*, *fimF*, *fimZ*, *fimY*, *fimW* et *stm0551*)

(230). Chez *S. enterica*, il existe entre 5 et 14 clusters de gènes fimbriae, la plupart du temps coexprimés

(231). Les fimbriae se fixent sur les motifs oligomannoses présentes en surface et sur les glycoprotéines des cellules intestinales (232).

1.4.1.1.2) L'invasion

L'adhésion des fimbriae à la cellule déclenche l'invasion de *Salmonella*. *Salmonella* est capable d'envahir les cellules non phagocytaires (comme les cellules intestinales), par deux systèmes : le système Zipper et le système Trigger (figure 20A, 20C) (233).

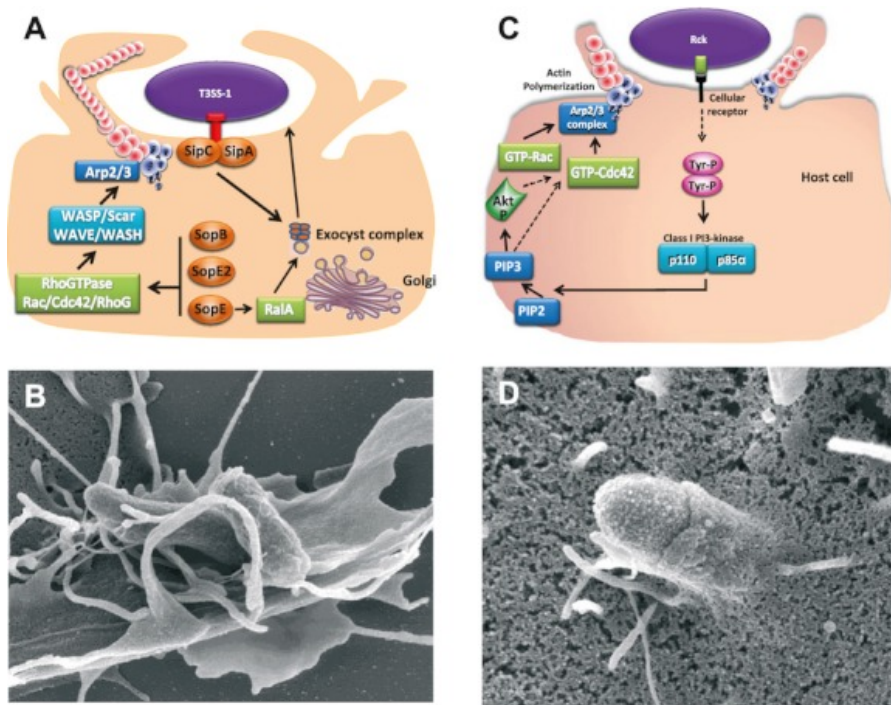


Figure 20 : Rôle des effecteurs du SST3-1 de *Salmonella* dans les cellules épithéliales (Selon Velge et al, 2012) **(A) Le système Trigger** est composé du SST3-1 qui injecte les effecteurs SipC, SipA, SopB, SopE et SopE2. Ces effecteurs induisent un fort remodelage du cytosquelette grâce à une cascade enzymatique conduisant à l'activation du complexe Arp2/3. Les effecteurs participent également au recrutement du complexe exocyste et l'internalisation de *Salmonella* au sein d'une vacuole. **(B)** Image de microscopie électronique à balayage de l'entrée de *Salmonella* dans la cellule intestinale par le **système Trigger**. **(C) Le système Zipper** est déclenché par la fixation du ligand bactérien Rck à des récepteurs cellulaires. Cette interaction conduit à la phosphorylation des tyrosines kinases intracellulaires. Après une cascade d'activation, l'activation des GTPase Rac1, l'activation de la kinase akt/PI et de la GTPase Cdc42 déclenchent la polymérisation de l'actine par le complexe Arp2/3. L'internalisation de *Salmonella* par le remodelage du cytosquelette est faible dans le **système Zipper**. **(D)** Image de microscopie électronique à balayage de l'entrée de *Salmonella* dans la cellule intestinale par le **système Zipper**

Le système Zipper implique la liaison d'un ligand de *Salmonella* (l'invasine Rck) à un récepteur cellulaire. Le système Zipper induit un faible réarrangement des protéines du cytosquelette par la voie GTP-Rac et n'implique pas d'effecteurs bactériens au sein de la cellule (Figure 20A, 20C).

Le système Trigger induit de forts réarrangements du cytosquelette cellulaire, connus sous le nom de « membrane ruffles », qui impliquent de nombreux effecteurs bactériens à l'intérieur de la cellule, avant l'entrée de la bactérie (Figure 20A)(233).

Les effecteurs protéiques bactériens du système Trigger sont injectés par le système de sécrétion de type III-1 (SST3-1). L'invasion des cellules non phagocytaires, par *Salmonella*, médiée par le SST3-1 a été très étudiée. Environ 30 protéines comprenant les protéines chaperonnes du SST3-1 et ses effecteurs sont codés par la séquence génétique « *Salmonella* Pathogenicity island-1 » (SPI-1) situé sur le chromosome bactérien. Il existe au total plus de 17 SPIs dans les deux espèces *S. bongori* et *S. enterica*. Seule SPI-1, SPI-4 et SPI-9 sont conservés entre les deux espèces (233). Chez *S. enterica*, le SST3-2 qui est encodée par SPI-2 a également un rôle majeur pour la suite de l'invasion. En effet, ce second système permet l'injection de nouveaux effecteurs stabilisant la protection de la vacuole appelée « *Salmonella*-containing vacuole » (SCV), formée après l'entrée de la bactérie (234). Le SST3-2 et ses effecteurs sont également importants dans le déplacement et la protection de la SCV.

1) Le SST3-1

Le SST3-1 se présente sous forme de seringue, on parle d'injectisome. Ce dernier va permettre la formation d'un pore au sein de la cellule eucaryote (235). Du haut vers le bas du système, l'injectisome du SST3-1 est composé de protéines chaperonnes InvB, SicA, SigE et SicP, puis d'un complexe régulier InvC, SpaL. L'anneau du système est constitué par InvK et SpaO. Les protéines de l'opéron PrgHK, InvALN, SpaPQRS ainsi que la protéine InvG se trouvent juste au-dessus de la structure principale. PrgI

est la protéine qui allonge le système de sécrétion sous forme de seringue. Enfin, SipB et SipD assure la formation du translocon du SST3-1. Le translocon permet la formation d'un pore dans la cellule épithéliale. Les effecteurs sont ensuite sécrétés à travers le translocon, puis interviennent dans la cellule hôte, pour effectuer un remodelage métabolique et mécanique de la cellule. Cette action permet l'invagination de la membrane cellulaire suivi de l'internalisation de la bactérie (236). Parmi les effecteurs du SST3-1, cinq protéines ont une action majeure sur le remodelage de l'actine : SipA, SipC, SopB, SopE et SopE2 (figure 19). SipA et SipC se fixent directement à l'actine et contrôlent la localisation et la polymérisation de l'actine. SopE, SopE2 et SopB activent les RhoGTPases Rac/Cdc42/RhoG, qui vont induire un remodelage du cytosquelette par les protéines WASP/Scar/WAVE/WASH. L'activation de ces protéines conduit à l'activation du complexe Arp2/3 (figure 19)(233). Par la voie Ras, reliée à la protéine RalA, SipC et SopE induisent le recrutement du complexe exocyste nécessaire à l'internalisation de *Salmonella* et la formation de SCV (figure 19A) (233). Les bactéries dépourvues de SopE et SopE2 ont une invasion significativement diminuée (237). D'autres effecteurs comme AvrA permettent d'inhiber la réponse inflammatoire de la cellule hôte et stabilisent les protéines impliquées dans les jonctions serrées, assurant la survie de la bactérie lorsqu'elle sera internalisée (238). AvrA pourrait également réguler l'autophagie de la cellule hôte pour contribuer à la survie intracellulaire de la bactérie (239).

2) Le SST3-2

Le répertoire des effecteurs du SST3-2 varie fortement entre les différents sérovars de *Salmonella*. Cependant, les analyses génomiques ont permis d'identifier six effecteurs centraux, communs à la grande majorité des sérovars : SseF, SseG, SteA, SifA, PipB et PipB2, actifs dans les cellules intestinales. Un autre groupe d'effecteurs compris dans le SST3-2 est fonctionnel pour certains sérovars intestinaux : SseL, SifB, SopD2, SseJ, SteB, SteC, Slrp et SseK2 (240).

A la suite de son internalisation dans les cellules épithéliales, *Salmonella* est ensuite englobée dans la SCV à l'intérieur de la cellule. La plupart des effecteurs du SST3-1 sont alors inhibés. Le déplacement de la SCV est assuré par le transport médié par la dynéine le long des microtubules de la cellule intestinale (Figure 20A)(234). Les premiers effecteurs sécrétés par le SST3-2 sont les protéines membranaires SseF et SseG. Elles permettent le regroupement et le positionnement des SCVs dans la cellule intestinale, en maintenant l'activité dynamique, autour des vacuoles bactériennes (241). Fonctionnellement liés à SseF et SseG, les effecteurs SteA se rassemblent dans les vacuoles élargies au cours de la croissance de *Salmonella* pour assurer la stabilité et le cloisonnement de la SCV (241). Les SCV sont également soumises aux défenses antibactériennes à l'intérieur de la cellule (242). SifA est capable de préserver l'intégrité et la stabilité de la SCV. SifA permet également de limiter les effets toxiques des lysosomes, en inhibant les récepteurs du mannose-6-phosphate (MPR). Les MPR acheminent les lysosomes à la membrane des SCVs pour libérer le lysozyme, induisant une destruction de la paroi bactérienne (243,244). SopD2 inhibe le transport de la SCV, ainsi que la formation de microtubules, jouant un rôle antagoniste à SifA dans la dynamique membranaire de la vacuole (245). Il est également lié à SteA. SteA et SopD2 sont impliqués dans la formation de filaments induits par la réplication de *Salmonella* dans les SCVs, appelés « *Salmonella*-induced filaments » (SIFs). Les SIFs sont formés à proximité de l'appareil de Golgi, se caractérisant par un réseau complexe et dynamique, au cours de la réplication de *Salmonella* dans les SCVs matures (240,246). Le rôle des SIFs n'est pas encore clair, mais des études montrent qu'ils permettent de détourner le métabolisme intracellulaire, pour protéger la membrane des SCVs contre les défenses de la cellule hôte et assurent la réplication intracellulaire de *Salmonella* (246). Les effecteurs PipB et PipB2 sont localisés au niveau des SIFs. Si le rôle de PipB n'est pas encore bien défini, PipB2 assure la dynamique, la motilité de *Salmonella* dans la cellule intestinale en entraînant une élongation des SIFs. Ils protègent également les SCVs contre

l'action des lysozymes (247,248). La réplication de *Salmonella* dans la SCV entraîne la formation de structures ubiquitinées, dans les cellules infectées, qui reconnues par le système d'autophagie p62, entraînent alors la dégradation de la bactérie. L'effecteur SseL permet d'inhiber cette réponse, favorisant ainsi la réplication de *Salmonella* dans la SCV (249). D'autres effecteurs, comme GtgA, empêchent la signalisation de la réponse inflammatoire, en inhibant la voie NF- κ B et la voie MAPK (Figure 21A) (250,251).

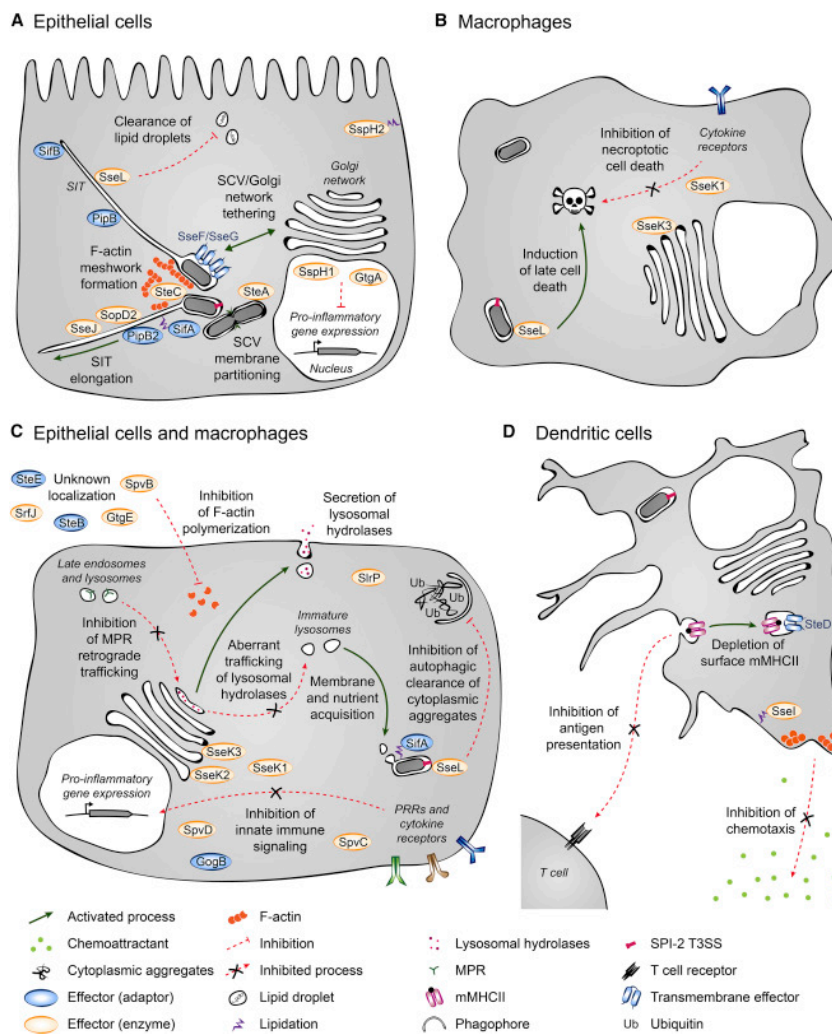


Figure 21 : Fonctions des effecteurs du SST3-2 de *Salmonella* dans les cellules épithéliales et les cellules phagocytaires. (Selon Jennings et al, 2017) (A), Ensemble des actions contre les effecteurs du SST3-2 dans les cellules épithéliales (B), dans les macrophages (C), dans les cellules épithéliales et les macrophages (D), dans les cellules dendritiques.

Il existe de nombreux autres effecteurs du SST3-2 qui ont été identifiés dans certains sérovars de *Salmonella*, pour qui le rôle n'est pas encore bien défini. Ces effecteurs sont retrouvés uniquement chez quelques sérovars de *Salmonella*, donc peu conservés (240). Il a également été montré que les effecteurs du T3SS-1 tels que SopB, SopE ou SopE2, peuvent également jouer un rôle important après l'internalisation, participant au maintien de la SCV et à la réplication de *Salmonella*, dans les cellules intestinales (252,253). Le mécanisme de pathogénicité de *Salmonella* est complexe et nécessite de nouvelles études pour mieux comprendre le fonctionnement de tous les effecteurs.

1.4.1.1.3) La translocation

Si certains sérovars de *Salmonella* restent confinés dans l'intestin, d'autres sont capables d'effectuer un phénomène plus rare, le phénomène de translocation. La translocation permet la dissémination de la bactérie dans l'organisme et dépend en grande partie de la pathogénicité du sérovar rencontré (233). Ce phénomène représente le passage d'une entérobactérie, de lumière intestinale vers la *lamina propria*. La majorité de la translocation de *Salmonella* s'effectue par les cellules M, par adhésion de *Salmonella* sur le marqueur Glycoprotéine 2 (GP2), spécifique des cellules M. La transcytose des cellules M facilite l'entrée des bactéries pathogènes, telle que *Salmonella*. Il existe également la translocation par les cellules entérocytes classiques, mais c'est un phénomène encore plus rare (figure 22). *Salmonella* peut aussi être captée par les prolongements des cellules dendritiques dans lesquelles elle va se diviser, pour se disséminer (254). Après avoir survécu dans la cellule intestinale et échappée au système immunitaire, *Salmonella* se retrouvent ensuite dans la *lamina propria*, et plus particulièrement dans les PdPs, qui font le lien avec les cellules M. *Salmonella* interagit ensuite avec les macrophages, elle les envahit par la phagocytose. *Salmonella* se multiplie ensuite dans des vacuoles, au sein des macrophages, à l'aide d'effecteurs principalement encodés par les gènes du SPI-2 (figure 21B). Certains effecteurs sont utilisés dans les cellules épithéliales et les

macrophages (figure 21C)(233,240,255). *Salmonella* est également capable d'infecter les cellules dendritiques, en étant également phagocytée (Figure 21D). La capacité de dissémination des sérovars de *Salmonella* dans l'organisme dépend fortement de leurs capacités à infecter les cellules phagocytaires (233). Les macrophages contenant *Salmonella* migrent ensuite par le système lymphatique, dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) comme la rate. *Salmonella* est ensuite libérée et peut rejoindre la circulation systémique pour se disséminer dans le reste de l'organisme (figure 22) (256).

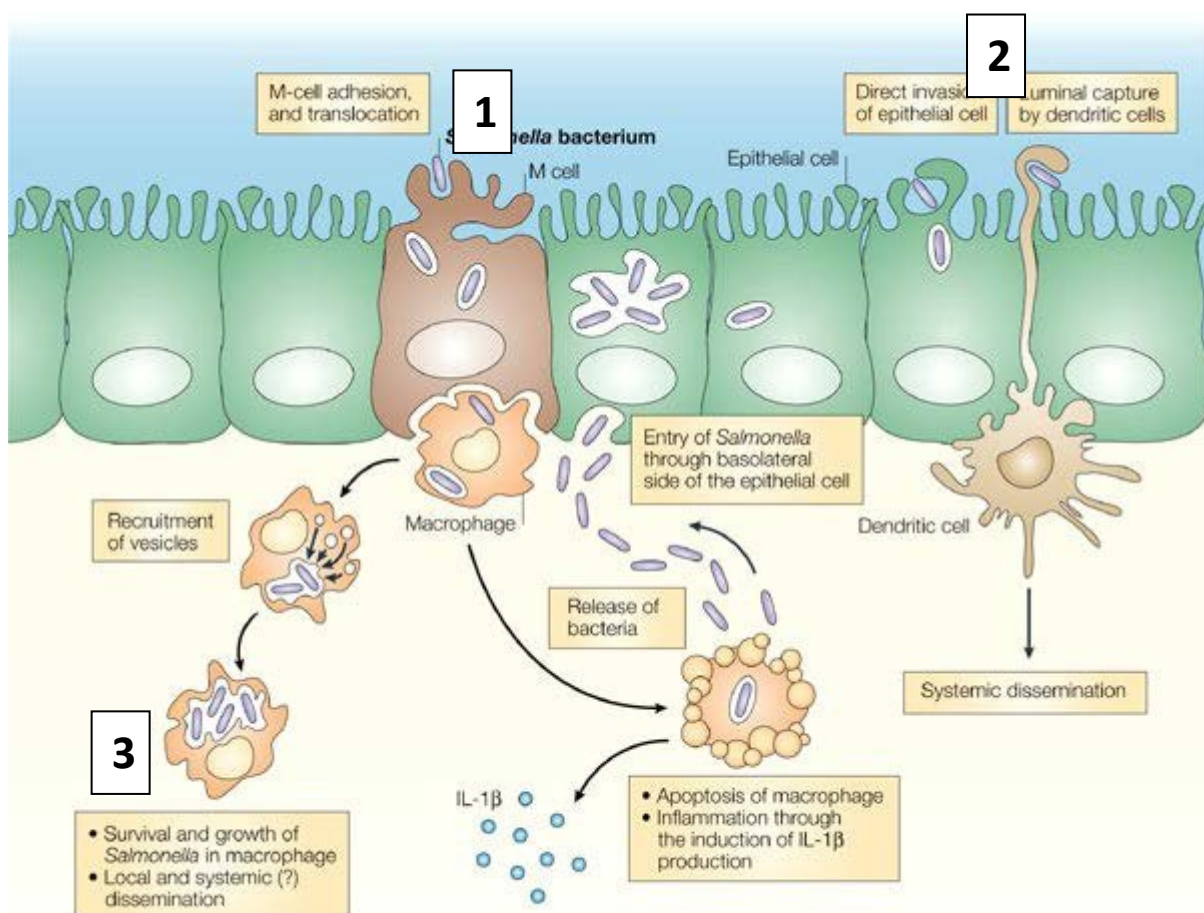


Figure 22 : Dissémination de *Salmonella*. (D'après Cota et al, 2015] *Salmonella* est capable d'effectuer le phénomène de translocation par les cellules M (dans la majorité des cas) (1), par les entérocytes, ou par le prolongement des cellules dendritiques dans la lumière intestinale (2). Elle rejoint ensuite les PdPs, situées dans la lamina propria. Elle est ensuite englobée par phagocytose dans les macrophages, qu'elle infecte. Elle peut ensuite se disséminer dans l'organisme (3).

Dans la plupart des cas, la pathogénicité de *Salmonella* se réduit à l'invasion des cellules intestinales ou les follicules immunitaires, conduisant majoritairement à des gastro-entérites. Chez l'Homme, la translocation amenant une dissémination de *Salmonella* dans l'organisme est rare, mais les complications peuvent amener à des symptômes sévères (bactériémies) qui nécessitent des traitements urgents. Chez l'animal, la dissémination de *Salmonella* est fortement représentée, amenant à de nombreuses pertes en élevage (257,258).

Des facteurs environnementaux comme la présence de fer peut engendrer des dysbioses et favoriser l'augmentation de l'adhésion, l'invasion et la translocation de *Salmonella* (259).

Après une infection, *Salmonella* peut se nicher et s'implanter à long terme sous la barrière intestinale dans laquelle une lutte contre l'immunité innée et adaptative peut perdurer pendant plusieurs années. Cette lutte induit une forte inflammation dans l'intestin. Le taux de persistance de *Salmonella* après infection est de 2,2% (de 30 jours à plusieurs années) (220). La présence de *Salmonella* symptomatique ou asymptomatique peut conduire à des risques de carcinogénèses au niveau du côlon (216). Des études montrent qu'une persistance du genre *Salmonella* est corrélée à l'apparition des MICI (171).

Salmonella n'est pas la bactérie la plus virulente et dangereuse pour l'Homme, cependant, un suivi des pathologies à long terme, liées à la persistance de *Salmonella* est nécessaire pour prévenir des pathologies chroniques inflammatoires. Les infections à *Salmonella* amènent également à de nombreuses pertes économiques chez les animaux d'élevages, comme les élevages de poulets ou les élevages porcins (260).

I.4.1.2) Traitements à l'aide antibiotiques et limites

Les antibiotiques sont aujourd'hui le seul traitement efficace utilisé contre les infections à *Salmonella*. À la suite de complications, les antibiotiques utilisés pour traiter les infections à *Salmonella* non-typhi sont la ciprofloxacine, la ceftriaxone et l'ampicilline (261,262). Cependant, de nombreuses études ont reporté l'apparition de résistances aux antibiotiques chez beaucoup de sérovars de *Salmonella*. Les bactéries développent des mécanismes incluant, des enzymes capables d'inhiber la perméabilité des antibiotiques, le développement des pompes d'efflux, ou la production de β -lactamase dégradant l'antibiotique (263,264). Les gènes de résistances peuvent se transmettre de manière horizontale à d'autres souches, ce qui accélère leur propagation (217). *Salmonella enterica* sérovar Heidelberg B182 (*S. Heidelberg*) possède des mutations au niveau des gènes Methyl Mismatch Repair (MMR), leur conférant des résistances aux antibiotiques (265). Elle est dénommée *S. Heidelberg hypermutatrice* (HM). Des gènes spécifiques à certaines souches, comme *tolC* sont impliqués dans le phénomène d'invasion par le SST3 de *Salmonella enterica* Typhimurium multirésistantes aux antibiotiques (266). Ces souches multirésistantes aux antibiotiques représentent une problématique actuelle, en lien avec la surconsommation d'antibiotiques. Les résistances aux antibiotiques chez *Salmonella* sont en pleine évolution ces dernières années et peuvent conduire à des échecs thérapeutiques (267). Elles augmentent le taux d'hospitalisation des infections à *Salmonella* non-typhi (268). Il est donc nécessaire de développer des traitements de substitution aux antibiotiques. Des traitements plus spécifiques aux pathogènes permettraient également d'éviter des désordres métaboliques et les dysbioses au niveau intestinal, à plus long terme. Parmi ces traitements, les probiotiques, l'utilisation de bactériocines ou la thérapie par l'utilisation des phages spécifiques de bactéries pathogènes, font parties des solutions envisagées (269). Cependant, d'autres pistes moléculaires sont nécessaires pour renforcer le nombre de traitements substituants les antibiotiques.

Ils pourraient, par la suite, être préventifs contre d'éventuelles infections et pathologies chroniques inflammatoires de l'intestin, pouvant être induite par *Salmonella*.

I.5) Les probiotiques

I.5.1) Définition

Selon la définition de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), « les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ». Les principales sources des probiotiques proviennent de souches bactériennes issues des aliments, tels que le lait cru ou des produits fermentés, de végétaux et fruits, mais peuvent également provenir de l'intestin grêle ou du côlon des animaux et de l'Homme (270). Les mécanismes d'action des probiotiques sont très variés : ils peuvent inhiber la prolifération de bactéries pathogènes ou améliorer la fonction de la muqueuse intestinale, par exemple (271). La régulation de l'immunité intestinale constitue le principal effet bénéfique induit par les souches bactériennes probiotiques. En effet, certains probiotiques peuvent atténuer les réponses inflammatoires intestinales et améliorer l'équilibre des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (272). L'inflammation est caractéristique des dysbioses intestinales associées aux pathologies intestinales (273). Une thérapie d'administration des probiotiques pourrait améliorer le diagnostic des patients atteints de ces pathologies intestinales.

I.5.2) Les probiotiques traditionnels : *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*

Historiquement, les premières bactéries décrites pour leurs effets bénéfiques sont les genres bactériens *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, principalement contenus dans les produits alimentaires fermentés (274).

Les *Lactobacillus* sont majoritairement d'origine alimentaire, même si certaines espèces colonisent très facilement l'intestin humain et peuvent y persister, comme *Lactobacillus reuteri* (275,276). *Lactobacillus rhamnosus* est capable d'induire une activation de macrophages en facilitant la phagocytose intestinale par l'augmentation du TNF- α , tout en diminuant l'inflammation systémique via la sécrétion d'IL-10 (277). *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus agilis* sont capables d'inhiber la croissance de *Campylobacter* spp. (278). *L. paracasei* réduit la population de *Clostridium difficile* chez l'Homme (279). L'administration en concentration élevée de *L. rhamnosus*, (entre 10^{10} et 10^{12} UFC) diminue la fréquence des diarrhées (280) et permet le maintien de la rémission des patients, atteints de colite ulcéreuse (281), tandis que *Lactobacillus acidophilus* améliore les ballonnements chez les personnes atteintes de troubles fonctionnels de l'intestin (282). Les résultats décrits sont cependant des observations effectuées après administration de souches *Lactobacillus*, mais les mécanismes d'action sont peu décrits.

Si le genre *Bifidobacterium* est fortement retrouvé dans les aliments fermentés, il fait également partie des premières bactéries colonisant le tractus gastro-intestinal humain, il est donc important dans le développement du microbiote intestinal chez un nouveau-né (283). La supplémentation des *Bifidobacteria* combinée à d'autres bactéries commensales prévient l'apparition de cellules cancéreuses chez les souris (284). L'administration de *B. breve* diminue l'incidence des nécroses entérocolites chez les nouveau-nés (285). L'administration des *Bifidobacteria* prévient aussi des infections gastro-intestinales par compétition avec les pathogènes (286). Les *Bifidobacteria* réduisent les risques de diarrhées liés aux rotavirus chez les enfants (287), des nécroses entérocolites (285), ainsi que des cancers colorectaux (288). *Bifidobacterium* est capable d'atténuer l'infection à *C. difficile* (289). *B. dentis* est capable de renforcer la barrière chimique, que constitue l'épithélium intestinal, en induisant une augmentation de la production de mucus par les cellules de Gobelet (290).

Les effets de l'administration des souches *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* seules ou en combinaison sont résumés dans le tableau 2.

L'administration de *Bifidobacterium* spp. et *Lactobacillus* spp. est utilisée par des millions de personnes dans le monde. Malgré tous les effets positifs, les mécanismes d'action directs des *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, sur l'épithélium intestinal, sont peu décrits, certaines études montrent que l'administration de *Bifidobacterium* peut remodeler le paysage du microbiote intestinal, sans savoir si ces changements du microbiote sont délétères pour l'intestin humain (291). De plus, des études montrent que l'administration de *Bifidobacterium* spp. et *Lactobacillus* spp. peut amener à des effets secondaires en fonction de la dose d'administration des souches (292). Le choix des espèces bactériennes, leur utilisation et leur mode d'administration, sont encore en cours d'investigation pour traiter ou prévenir les pathologies intestinales.

Tableau 2 : Effets de l'administration de souches de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* dans l'intestin

Souches administrées	Effets	Références
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Augmentation des Lipoprotéines hautes densités et de l'insuline dans le sérum	(293)
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	Diminution de la taille et du nombre des tumeurs CRC	(294)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Induction de la migration des entérocytes et augmentation de la diversité des taxons chez la souris	(295)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Diminution de l'IL-1 β , développement positif du porcelet en modifiant la composition du microbiote	(296)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Amélioration des symptômes dans le cas de MICI chez l'Homme	(297)

<i>Lactobacillus reuteri</i>	Décroissance de la durée des diarrhées dans le cas de gastro-entérite humaine	(298)
<i>Bifidobacterium longum</i>	Décroissance de l'abondance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans le sang, le foie et le jéjunum chez la souris	(299)
<i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	Diminution de TNF- α , IL-6, IL-12, MCP-1, IL-8, augmentation de l'IL-10	(300)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>	Réduction de l'IL-8, modulation de l'expression de TLR 2 et des voies inflammatoires MAPK et NF- κ B	(301)

1.5.3) Les probiotiques de nouvelle génération et leurs métabolites

L'identification des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* ont montré de nombreuses vertus sur la santé humaine. Cependant, les effets démontrés sont marginaux et ne ciblent pas spécifiquement une pathologie. De plus, les mécanismes d'action ne sont pas complètement élucidés (302). L'apparition de nouveaux probiotiques est donc nécessaire pour cibler les pathologies intestinales. Les probiotiques traditionnels ont un aspect sécuritaire, car ils proviennent majoritairement des aliments. Les nouveaux probiotiques ciblés sont quant à eux, des espèces bactériennes issues du microbiote intestinal humain. Certaines de ces bactéries, selon de nombreuses études, sont diminuées dans les pathologies intestinales humaines. La corrélation entre la diminution de bactéries commensales dans le tractus intestinal et l'apparition des pathologies intestinales pourrait indiquer que certaines bactéries confèrent un effet positif sur l'intestin. Leur ré-administration pourrait alors être bénéfique dans le cas de pathologies spécifiques. Ces espèces bactériennes ciblées sont appelées probiotiques de nouvelle génération (PNGs) (303). Les potentiels PNGs doivent répondre à de nombreux critères pour être utilisés dans le cadre de la santé humaine. Ils doivent montrer une validité fonctionnelle sur des lignées cellulaires *in vitro*, sur des modèles animaux *in vivo* ainsi que lors d'essais cliniques chez

l'Homme (302). De plus, si la caractérisation des effets bénéfiques est très avancée ; la tolérance, la sécurité et la mise en place d'une administration des PNGs chez l'Homme doivent être très contrôlées.

Les analyses bio-informatiques ont par la suite permis l'identification de bactéries commensales diminuées dans les pathologies intestinales incluant les MICI, le CRC, l'obésité et le DT2. Parmi les bactéries commensales diminuées, certaines ont démontré des effets bénéfiques *in vitro* et *in vivo*. Les plus documentées sont *Bacteroides fragilis* (171,195,304,305), le genre *Roseburia* (172,173,186,194,195), *Akkermansia muciniphila* (176,191–193,195) et *Faecalibacterium prausnitzii* (168,173,186,195,197,306,307), mais il en existe beaucoup d'autres (302). Ces bactéries commensales font parties des candidats les plus intéressants pour être utilisés comme PNGs dans le cadre de la santé humaine.

Les PNGs ciblés (ci-dessus) ont une autre caractéristique intéressante. En effet, ils produisent de nombreux métabolites décrits comme bénéfiques pour l'équilibre intestinal. Ainsi, l'étude des métabolites produits par les potentiels PNGs, a augmenté de manière croissante ces dernières années. Parmi les métabolites, les plus documentés, il y a les acides gras à chaîne courte (AGCC), comprenant l'acétate, le propionate et le butyrate. Dans le colon, le ratio de ces 3 métabolites est de 3:1:1, l'acétate est produit dans le colon distal uniquement, tandis que le propionate et le butyrate sont produits dans le colon proximal et distal. La concentration de ces AGCC est dépendant du régime alimentaire, mais elle est globalement comprise entre 20-140 mM (millimolaire) dans l'intestin, 70-140 mM dans le colon proximal, 20-70 mM dans le colon distal et 20-40 mM dans l'iléon distal (71,72).

D'autres métabolites sécrétés par les bactéries commensales, comme les acides biliaires secondaires, les dérivés indoles, les polyamines, la désaminotyrosine, les dérivés de la sérotonine, montrent des effets bénéfiques intéressants pour la santé humaine (décrit tableau 1 section II revue),

(figure 23). Ces métabolites, produits par les PNGs, sont capables d'être absorbés par l'intestin pour se retrouver dans la circulation sanguine et réguler l'homéostasie dans d'autres organes plus distants tels que le cerveau.

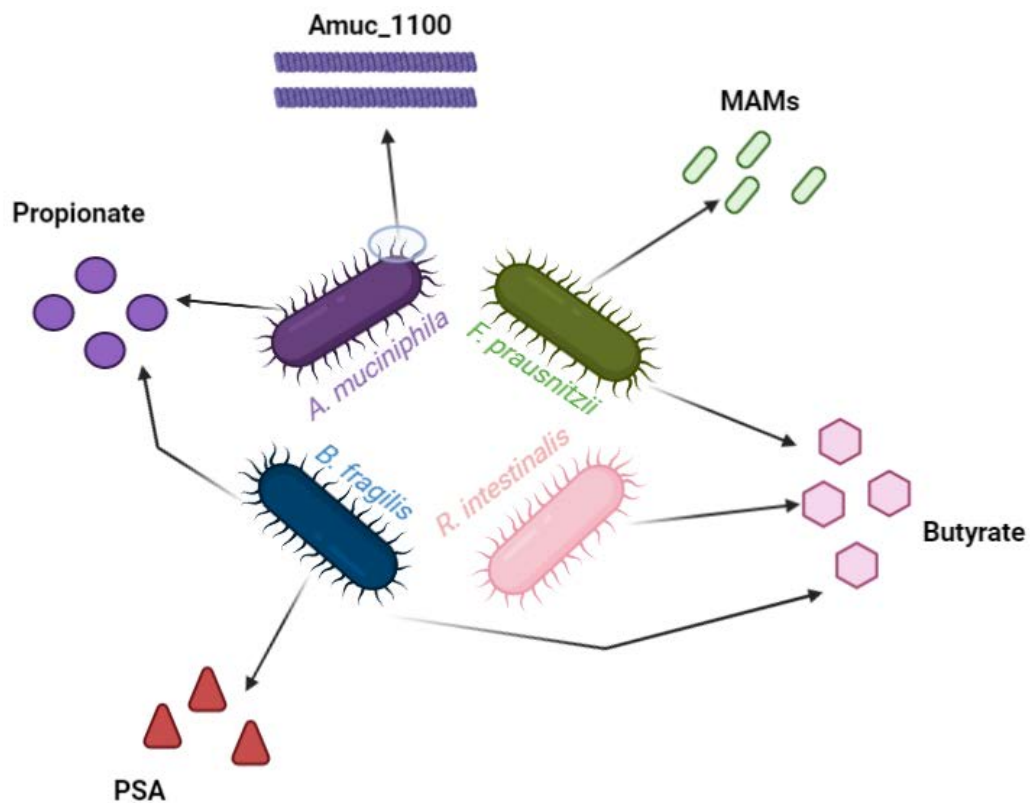


Figure 23 : Métabolites produits par les PNGs. Les potentiels PNGs sécrètent différents métabolites exerçant des effets bénéfiques pour l'intestin et dont les effets bénéfiques ont été documentés dans la littérature. Certains métabolites sont communs à plusieurs espèces intestinales. Le propionate est synthétisé par *A. muciniphila* et *B. fragilis*. Le polysaccharide A (PSA) est sécrété par *B. fragilis*. Le butyrate est sécrété par *F. prausnitzii*, *R. intestinalis* et *B. fragilis*. Les molécules anti-inflammatoires microbiennes (MAMs) sont sécrétées par *F. prausnitzii* et Amuc_1000 est une protéine présente sur les pili d'*A. muciniphila*. (Figure créée à partir de Biorender).

1) *Bacteroides fragilis*

B. fragilis est une bactérie anaérobie Gram négatif appartenant au phylum Bacteroidota qui colonise naturellement le tractus intestinal (309). Il existe deux types de souches : les souches ETBF (Enterotoxigenic *B. fragilis*) et les souches NTBF (Nontoxigenic *B. fragilis*). Les ETBF possèdent un îlot de pathogénicité : « *B. fragilis* pathogenicity island » (BfPAI) encodant une toxine BFT pouvant être responsables de pathologies intestinales telles que le CRC (310). Les souches NTBF ne contiennent pas l'îlot de pathogénicité et présentent quant à elles des effets bénéfiques sur l'homéostasie intestinale. La diminution du genre *Bacteroides* est corrélée à l'apparition de différentes pathologies intestinales (171,195,304). Parmi les NTBF, La souche *Bacteroides fragilis* ZY-312 a montré des effets potentiellement favorables à la santé lorsqu'elle est incubée avec des colonocytes et des macrophages, elle améliore le diagnostic des diarrhées associées à une prise d'antibiotiques. A une forte concentration, *Bacteroides fragilis* ZY-312 induit une augmentation de l'expression des protéines de la mucine (MUC-2) et des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires (ZO-1 et de Occludine), chez les rats atteints de la pathologie associée à une prise d'antibiotiques (311). Certains mécanismes concernant les effets bénéfiques de NTBF ont été identifiés. En effet, la souche NTBF ATCC 9343, sécrète le polysaccharide A (PSA), identifié comme une molécule immunomodulatrice (305,312). Le PSA permet de diriger le développement des lymphocytes TCD4+ et la maturation du système immunitaire, au cours de l'étape de colonisation du microbiote intestinal (305). Il peut également interagir avec le TLR2 des cellules dendritiques (DC) et les récepteurs des lymphocytes T. Cette interaction induit une augmentation de la production de cellules lymphoïdes innées (ILC), mais aussi une stimulation de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (309,312). En outre, le PSA est un immunomodulateur qui semble important pour la mise en place de l'immunité intestinale et la balance inflammatoire. Une partie des effets bénéfiques des souches NTBF peut également être expliquée, par

la production des AGCC, tels que l'acétate, le propionate et le butyrate (313). *B. fragilis* est un candidat PNG intéressant, mais les études *in vitro*, *in vivo* et chez l'Homme doivent se poursuivre, pour caractériser l'intégralité des effets bénéfiques médiés par cette bactérie et ses métabolites.

2) *Roseburia intestinalis*

Roseburia fait partie du phylum Bacillota, classe des *Clostridium* dans la famille très étudiée des *Lachnospiraceae*. C'est une bactérie à Gram négatif qui est anaérobie stricte et ayant 20 à 35 flagelles selon les souches (314). Productrice de butyrate, *Roseburia intestinalis* a été isolée et identifiée en 2002 (315). Elle est diminuée chez les patients atteints d'obésité, de DT2, de MICI ou encore pour certaines pathologies cérébrales (172,173,186,194,195), elle pourrait donc être utilisée comme un biomarqueur de ces pathologies. Il a été décrit que *R. intestinalis* était capable d'augmenter l'abondance des lymphocytes T régulateurs (Treg), d'induire la production de TGF- β , permettant ainsi de diminuer l'inflammation intestinale chez la souris (316), mais aussi sur les macrophages *in vitro* (317). *R. intestinalis* diminue également la perméabilité intestinale en régulant positivement les protéines de jonctions intercellulaires (Claudines (Cldn3 et Cldn4)) chez la souris (318). Dans un modèle de colite induite par la solution d'acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique (TNBS), *R. intestinalis* induit la diminution de l'IL-17, cytokine pro-inflammatoire retrouvée augmentée dans la plupart des MICI (319), ainsi que la diminution de l'inflammation des cellules épithéliales de l'intestin, en activant le récepteur TLR5. L'activation de ces mécanismes amène à une diminution de la circulation des cytokines pro-inflammatoires dans le plasma. Ce phénomène anti-inflammatoire peut également être induit via le régulateur de flagelline (miR)-223-3p de *R. intestinalis*, impliqué dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 (320). La supplémentation en butyrate entraîne une diminution significative du pouvoir oxydatif des monocytes tout en diminuant le TNF- α (321). Des études *in vitro* montrent que le butyrate a également un rôle dans le DT2 et l'obésité. L'activité anti-oncogénique du butyrate a été démontrée

in vitro, en induisant une diminution du facteur de la division cellulaire, en régulant l'expression de la protéine « chromosome segregation 1-like » (CSE1L) sur des lignées entérocytaires p53-/- (322). Tout comme *B. fragilis*, les études sur les mécanismes d'action de *R. intestinalis* doivent se poursuivre pour l'utiliser comme PNG, dans le cadre de santé humaine.

3) *Akkermansia muciniphila*

A. muciniphila est une bactérie à Gram négatif appartenant au phylum *Verrucomicrobiota*. *A. muciniphila* est connue pour avoir un impact sur la modulation de l'immunité, les troubles métaboliques et la protection des cellules épithéliales dans l'intestin. La diminution d'*A. muciniphila* est corrélée à une augmentation du poids chez l'Homme et la souris. Le traitement de souris obèse par administration de *A. muciniphila* rétablit les troubles métaboliques induit par l'obésité, tels que l'accumulation de masse grasseuse, l'inflammation du tissu adipeux et la résistance à l'insuline (191,323). L'administration d'*A. muciniphila* renforce l'épithélium intestinal en augmentant l'expression des protéines des jonctions serrées, ZO-1 et de l'Occludine *in vitro* et *in vivo* (324). Une autre particularité d'*A. muciniphila* est l'induction de la production de mucus et de la prolifération des cellules de Gobelet dans la crypte intestinale (325). *A. muciniphila* augmente l'expression de MUC-2 et de Tff2 (325). Les études sont fortement avancées sur les caractéristiques d'*A. muciniphila*. En effet, une étude menée par l'équipe de Patrice Cani en 2019, démontre dans un premier temps que l'administration d'*A. muciniphila* était sûre, tolérée et n'engendrait pas de changement de structure du microbiote intestinal chez les patients obèses. Dans un second temps, l'administration de 10^{10} *A. muciniphila* a réduit le poids corporel ainsi que la masse grasseuse, mais de manière non significative, ainsi qu'une réduction de certains marqueurs sanguins (326). La protéine du pili de la membrane externe d'*A. muciniphila*, Amuc_1100 (figure 21), a été identifiée comme activant les signaux intracellulaires médiés par le TLR2 des cellules épithéliales intestinales, contribuant ainsi au

renforcement de la barrière intestinale (327). *A. muciniphila* est également connue pour produire du propionate dans l'intestin. Des études montrent que le propionate est capable de stimuler significativement la production de deux hormones intestinales, PYY et GLP-1, sur des cellules de colons humains (86,87). PYY et GLP-1 sont les régulateurs de la prise alimentaire et de la glycémie. Un défaut de production de ces deux hormones peut conduire à l'obésité ou le DT2 (329). Le propionate a également des effets anti-inflammatoires, en diminuant la sécrétion de chimiokines telles que CXCL9, 10, 11 et CCL3 (330). Si les mécanismes ne sont pas encore élucidés, les études d'*A. muciniphila* sont fortement avancées chez l'Homme, avec et les analyses de la première étude clinique en 2019, font de cette bactérie un des PNGs le plus prometteur pour l'avenir.

4) Faecalibacterium prausnitzii

F. prausnitzii est une bactérie à Gram positif qui appartient au phylum Bacillota. *F. prausnitzii* est l'une des premières bactéries identifiées comme potentiel PNG. Différentes études *in vitro* ont montré que *F. prausnitzii* inhibe l'inflammation en diminuant les cytokines inflammatoires (facteur de nécrose tumorale α (TNF α), et les interleukines, IL-1B, IL-6, et IL-8) et en augmentant l'IL-10 (331). Des effets bénéfiques ont été démontrés chez la souris par l'inhibition de l'expression génétique de l'IL-10, IL-27, CD39, indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygénase (IDO-1), et programmed death-ligand 1 (PDL-1), et est capable d'inhiber la régulation positive des molécules de costimulation, ainsi que leur production de cytokines pro-inflammatoires IL-12 et TNF α (331). En association avec le TLR-2 et l'hétérodimère TLR6, *F. prausnitzii* diminue également l'expression de TLR4, entraînant une diminution de l'inflammation intestinale (331). Des molécules anti-inflammatoires microbiennes (MAMs) constituées de sept peptides ont été identifiées dans le surnageant de culture de *F. prausnitzii* (332). Des effets anti-inflammatoires, par inhibition de la voie NF- κ B *in vitro* ont été identifiés. Les MAMs induisent un effet anti-inflammatoire en diminuant dans un même temps les niveaux des cytokines inflammatoires IL-5,

IL-8 et IL-17, tandis que le niveau des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 est augmenté (306,332–334). Tout comme *R. intestinalis*, *F. prausnitzii* est connue pour produire également du butyrate (335). Une étude menée par l'équipe de Harry Sokol en 2018, considérée comme pionnière menée sur 20 patients souffrants de CD, démontre que le groupe composé par une population normale en *F. prausnitzii* était en rémission, alors que le groupe présentant un déficit en *F. prausnitzii* était en rechute, 6 mois après la chirurgie iléo-caecal. De plus, *F. prausnitzii* et son surnageant avaient un effet protecteur, en induisant une augmentation de cytokines anti-inflammatoires et une diminution des cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de colite *in vitro* (307). Chez l'Homme, dans le cas d'obésité, l'administration de *F. prausnitzii* pourrait inhiber la cascade d'inflammation TLR4, MyD88, NF-κB, la résistance à l'insulinémie, ainsi que les marqueurs d'infiltrations et de recrutement des macrophages TNF-α, IL-6, CCR2 (336). Tout comme *A. muciniphila*, *F. prausnitzii* est l'un des potentiels PNG le plus avancé. La poursuite des études qui lient *F. prausnitzii* et sa relation à l'intestin, complétée par des études cliniques, pourraient conduire au développement d'un traitement dans le cadre de pathologies intestinales chroniques spécifiques.

Les potentiels PNGs sont capables de sécréter des métabolites permettant de maintenir l'homéostasie de nombreuses fonctions métaboliques, dans l'intestin. Ces métabolites peuvent ensuite être absorbés par l'intestin, puis se distribuer dans d'autres organes, à partir de la circulation sanguine, pour jouer à distance de leur lieu de synthèse.

1.5.4) Les métabolites bactériens communiquent avec les autres organes

1a) Axe intestin-cerveau

De nos jours, l'intestin est décrit comme le deuxième cerveau. Il existe aussi un lien bidirectionnel entre l'intestin et le cerveau. Le système nerveux est soumis à différents facteurs environnementaux tels que l'émotion ou le stress. La libération de corticotropine par l'hypothalamus stimule la sécrétion de l'adrénocorticotrope (ACTH) par l'hypophyse. L'ACTH entraîne la libération de cortisol au niveau des glandes surrénales. Parallèlement, le système nerveux central communique également avec l'intestin pour cibler le SNE, mais aussi la muqueuse intestinale et l'immunité. Le cerveau joue donc un rôle sur le métabolisme intestinal et peut moduler le microbiote intestinal par cette voie nerveuse (337). De son côté, le microbiote intestinal a une influence sur le stress, les comportements anxieux et dépressifs. L'administration d'antimicrobiens chez des souris « specific pathogen-free » (SPF) augmente le comportement explorateur de la souris et modifie l'expression de « brain-derived neurotropic factor » (BDNF) au niveau de l'hypothalamus (338). Le microbiote intestinal, par le métabolisme du tryptophane, induit la synthèse de molécules neuro-actives : la 5-HT, la tryptamine, les composés indoles, qui pourraient avoir un rôle important dans la physiologie neuronale, et sur l'humeur (339). L'axe bidirectionnel intestin-cerveau comporte de plus en plus d'études, sur la capacité du microbiote intestinal à moduler le comportement ou la physio-neurologie. Des recherches récentes impliquent la présence du peptide bactérien ClpB, produit par certaines souches d'*E. coli*, qui pourrait être à l'origine d'anorexie nerveuse en traversant la barrière hémato-encéphalique (340). De nombreuses recherches incriminent également les dysbioses intestinales dans les pathologies d'Alzheimer et Parkinson par l'augmentation du ratio Bacillota/Bacteroidota, corrélé au dépôt de la protéine A β , responsable de la nécrose neuronale, au niveau cérébral (341–344).

1b) Axe intestin-poumons

Dès la naissance, une corrélation entre la composition du microbiote intestinal et pulmonaire existe. La modification du régime alimentaire chez le nouveau-né influence la composition du microbiote pulmonaire (345). Différentes études ont décrit que l'axe intestin-poumon est impliqué dans plusieurs pathologies (346). Certaines études ont montré que les pathologies pulmonaires peuvent être aggravées par un trouble du microbiote intestinal. Ainsi, La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est aggravée par une carence en nutriments associée à une diminution des molécules anti-inflammatoires sécrétées par des bactéries commensales (347). Une autre pathologie pulmonaire, qui est la mucoviscidose, pourrait également être aggravée par un trouble du microbiote intestinal chez les enfants. La diminution des *Bacteroides* spp. a été associée à une augmentation de l'IL-8 et de l'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose. L'abondance du genre *Lachnospira* et de l'espèce *Clostridium neonatale* est associée à l'asthme chez les enfants (348). De plus, une abondance réduite d'*Akkermansia*, de *Bifidobacteria* et de *Faecalibacteria* dans l'intestin néonatal a été associée à un risque de développer de l'asthme (349). Le microbiote intestinal ne module pas seulement l'équilibre de l'immunité dans l'intestin, mais contrôle également les troubles du tractus respiratoire dans les poumons et induit des variations de la composition du microbiote pulmonaire.

II) Les probiotiques de nouvelle génération et leurs métabolites, moyen de communication dans l'axe intestin-poumons

Au cours de ma première année de thèse, à la suite de la pandémie du SARS-CoV-2 (COVID-19), entraînant un confinement en mars 2020, nous avons été amenés à nous questionner sur le rôle du microbiote intestinal et son impact sur les poumons. Nous avons ainsi réalisé une étude bibliographique, sur les souches bactériennes, présentées comme PNGs, et leurs impacts sur les poumons.

Il existe les probiotiques classiques, comme *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, qui sont principalement issus des produits alimentaires fermentés tel que le lait. Identifiés plus tard, les PNGs, sont issus du microbiote intestinal. Alors que les probiotiques classiques présentent généralement des effets marginaux, les PNGs commencent à se révéler comme des outils thérapeutiques prometteurs (302). Les potentiels PNGs sont des bactéries qui regroupent un large éventail de genre et d'espèces bactériennes commensales, dont certaines sont fortement diminuées dans les pathologies intestinales (MICI, DT2, CRC, obésité...).

Notre travail bibliographique a conduit à la rédaction d'une revue, publiée en mai 2021 (350). Cette revue définit les PNGs, ainsi que l'effet de leurs métabolites capables de circuler et d'agir jusqu'aux poumons. Les PNGs comme *F. prausnitzii*, *B. fragilis* et *A. muciniphila* exercent des effets anti-inflammatoires, renforcent l'intégrité de l'épithélium intestinal, en activant l'expression des gènes codant pour des protéines des jonctions serrées entre les entérocytes. Ils peuvent également activer la production du mucus dans l'intestin. En établissant l'homéostasie intestinale, les PNGs peuvent aussi moduler l'axe intestin-poumon. En effet, les métabolites produits par les PNGs (tableau 1 – Revue) exercent non seulement des effets bénéfiques au niveau de l'intestin, mais passent également dans la

circulation sanguine, pour rejoindre d'autres organes, dont les poumons. Parmi les métabolites décrits dans la littérature, certains exercent des effets bénéfiques, dans le contexte d'une infection virale du tractus respiratoire.

Parmi les métabolites bactériens ayant une activité dans les poumons, il y a le butyrate, qui régule l'inflammation en inhibant la différenciation des macrophages et en réduisant l'infiltration des neutrophiles dans les poumons. La désaminotyrosine (DAT) est un autre métabolite bactérien qui inhibe la réplication virale, en régulant les récepteurs des interféron- α/β (IFNAR). Les acides biliaires secondaires, dont l'acide chenodésoxycholique (CDCA) et ses dérivés, l'acide ursodésoxycholique (UDCA) et l'acide hyodésoxycholique (HDCA), sont capables d'inhiber la réplication du virus influenza dans les cellules pulmonaires, tout en régulant l'environnement inflammatoire pulmonaire induit par cette infection virale.

L'hypothèse d'une administration des potentiels PNGs et/ou leurs métabolites, pour pallier la dysbiose, dans le cas de la COVID-19, comme traitement alternatif a alors été analysée. Cependant, la revue bibliographique a été publiée un an après l'épidémie de SARS-CoV-2, les connaissances sur le virus étaient alors très limitées et les effets à long terme étaient inconnus. Depuis, il a été montré que chez les patients atteints de la COVID-19, la dysbiose intestinale persistait 6 mois après l'infection (351). D'autres études, en 2022, montrent que la composition du microbiote intestinal, au moment de l'infection SARS-CoV-2, contribuent au phénotype inflammatoire couramment retrouvé, chez les patients atteints de la COVID-19 (352–354). Il a été montré que les bactéries du microbiote intestinal jouant un rôle anti-inflammatoire comme *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectales* et *Bifidobacterium adolescentis* sont diminués chez les patients COVID-19 tandis que les bactéries pathogènes *Rothia*, *Erysipelatoclostridium*, *Ruminococcus dorei* sont augmentés (355). Il a été montré

que la transplantation fécale est capable de rétablir la diversité du microbiote intestinal, et renforcer le système respiratoire des patients souffrants de COVID-19 (356).

Cependant, il faut rester prudent, car la perturbation du microbiote intestinal, ne pourrait être qu'un facteur aggravant des symptômes induits par le SARS-CoV-2, en plus de tous les autres facteurs qui avaient été décrits peu de temps après la pandémie (357).



Review

Next-Generation Probiotics and Their Metabolites in COVID-19

Thomas Gautier ¹, Sandrine David-Le Gall ¹, Alaa Sweidan ², Zohreh Tamanai-Shacoori ¹, Anne Jolivet-Gougeon ¹, Olivier Loréal ¹ and Latifa Bousarghin ^{1,*}

¹ UMR 1241, Nutrition Metabolisms and Cancer Institute, Inserm, INRAE, Université de Rennes 1, 35000 Rennes, France; thomas.gautier@univ-rennes1.fr (T.G.); sandrine.legall-david@univ-rennes1.fr (S.D.-L.G.); zohreh.shacoori@univ-rennes1.fr (Z.T.-S.); anne.gougeon@univ-rennes1.fr (A.J.-G.); olivier.loreal@univ-rennes1.fr (O.L.)

² Laboratory of Microbiology, Department of Life and Earth Sciences, Faculty of Sciences I,

Lebanese University, Hadath Campus, P.O. Box 6573/14 Beirut, Lebanon; alaa.sweidan@hotmail.com

* Correspondence: latifa.bousarghin@univ-rennes1.fr; Tel.: +33-2232-3489-8

Abstract: Since December 2019, a global pandemic has been observed, caused by the emergence of a new coronavirus, SARS CoV-2. The latter is responsible for the respiratory disease, COVID-19. The infection is also characterized by renal, hepatic, and gastrointestinal dysfunctions suggesting the spread of the virus to other organs. A dysregulated immune response was also reported. To date, there is no measure to treat or prevent SARS CoV-2 infection. Additionally, as gut microbiota composition is altered in patients with COVID-19, alternative therapies using probiotics can be considered to fight SARS CoV-2 infection. This review aims at summarizing the current knowledge about next-generation probiotics (NGPs) and their benefits in viral respiratory tract infections and in COVID-19. We describe these bacteria, highlighted by studies using metagenomic approaches. In addition, these bacteria generate metabolites such as butyrate, desaminotyrosine, and secondary bile acid, suggested to prevent viral respiratory infections. Gut microbial metabolites transported via the circulation to the lungs could inhibit viral replication or improve the immune response against viruses. The use of probiotics and/or their metabolites may target either the virus itself and/or the immunologic process. However, this review showed that more studies are needed to determine the benefits of probiotics and metabolite products in COVID-19.

Keywords: SARS CoV-2; next-generation probiotic; butyrate; secondary bile acids; desaminotyrosine



Citation: Gautier, T.; David-Le Gall, S.; Sweidan, A.; Tamanai-Shacoori, Z.; Jolivet-Gougeon, A.; Loréal, O.; Bousarghin, L. Next-Generation Probiotics and Their Metabolites in COVID-19. *Microorganisms* **2021**, *9*, 941. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050941>

Academic Editor: Lionel Breton

Received: 12 April 2021

Accepted: 26 April 2021

Published: 27 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Since December 2019, a global pandemic has been observed. It was caused by the emergence of a new coronavirus, the SARS CoV-2, characterized by a respiratory disease (COVID-19, coronavirus disease-19) which can lead to respiratory distress and be life-threatening [1]. The SARS CoV-2 virus is a *Coronaviridae* of the genus *Betacoronavirus*, also including SARS CoV (2003) and MERS CoV (2012). During a severe form of SARS CoV-2 infection, renal, hepatic, and gastrointestinal dysfunctions are observed. It is not yet clear whether they are related to the spread of the virus's impact to other organs and/or to the systemic consequences of hypoxia and immune response. A dysregulated immune system was reported in a cohort of 452 patients with laboratory-confirmed COVID-19 [2]. An increase in the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), and T lymphopenia, including a decrease in CD4+ T cells, was common among patients with COVID-19 [2]. This indicates a serious disturbance in the immune environment that likely reflects a critical condition in severely infected cases. Similar to SARS and MERS, higher serum levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, and IL-6) and chemokines (IL-8) were found in patients with severe COVID-19 forms compared to individuals with mild disease. Models of animals with SARS CoV and MERS CoV showed marked inflammatory and immune responses which may activate a cytokine storm, leading to vascular leakage, and abnormal T-cell and macrophage responses. This will induce acute lung injury, acute respiratory

distress syndrome, or even death [3]. Based on the genetic homology and pathologic features of the infected lung, a cytokine storm was predicted to prevail in patients severely affected during SARS CoV-2 infection [4]. It has been shown to have a marked increase in interleukin 1 β (IL-1 β), interferon γ (IFN- γ), interferon-inducible protein 10 (IP-10), and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1).

Unfortunately, to date, there is no definitive medication to prevent or treat SARS CoV-2 infection. Several treatments are currently being evaluated in a strategy of repositioning [5]. Despite the fact that encouraging results are emerging, other complementary tracks must be followed to confirm their efficiency. This review aimed to summarize the current knowledge about next-generation probiotics (NGPs) and their metabolites to prevent virus-induced respiratory infectious diseases, such as COVID-19.

2. COVID-19 and Gut Microbiota

Several studies indicated that gut microbiota composition was altered in patients with COVID-19 [6–8]. They had intestinal microbial dysbiosis with decreased *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [9]. Indeed, other bacteria are also disrupted. *Collinsella*, *Streptococcus*, *Morganella* were more abundant in patients with high SARS CoV-2 infectivity, whereas *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Alistipes*, and *Lachnospiraceae* had higher abundances in patients with low to no SARS CoV-2 infectivity [10]. COVID-19 has been mainly fatal in elderly patients where gut microbiota diversity is decreased [11]. The most prevalent commensals in a healthy population with a median age of 48 years old are *Eubacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia*, and *Lachnospiraceae* taxa, while in COVID-19 patients with a median age of 55 years old, these commensals decrease, and opportunistic pathogens, such as *Clostridium hathewayi*, *Actinomyces viscosus*, and *Bacteroides nordii*, are increased [12]. Several gut commensals with known immunomodulatory potential, such as *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, and bifidobacteria, were underrepresented in COVID-19 patients [13].

By using a non-human primate model (the macaque) that recapitulates mild COVID-19 symptoms, it was described that SARS CoV-2 infection is associated with changes in the gut microbiota's composition and functional activity [14].

3. Probiotics as a Useful Treatment in Viral Respiratory Infections

Complementary and alternative therapies have been proposed worldwide to cure or prevent respiratory viral infections. Several viruses are known to cause respiratory infections in humans. Causative agents include respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus, enterovirus (EV), coronavirus, influenza virus, and adenovirus [15]. Probiotics have been proposed as a potential treatment during a viral respiratory infection. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations and World Health Organization (WHO) have defined them as microorganisms that can induce beneficial health effects. They are known to balance the interaction between host gut microbiota and the immune system and may promote resistance against pathogens [16]. Thus, they have been suggested to prevent and treat viral respiratory tract infections [17]. Probiotics have been described to reduce acute upper respiratory tract infections [18]. In addition, meta-analyses on the probiotic effect on children suggested a reduced risk of the upper respiratory tract [19,20].

The most common probiotic strains, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, have been used in several studies [21]. Many studies have shown that the oral administration of different strains of *lactobacilli* protects against influenza virus [22,23]. *Bifidobacterium* has shown anti-influenza virus potential as a probiotic by modulating the gut immune system [24–26].

4. NGPs Include Promising Strains

Traditional probiotics, such as *Bifidobacterium* and *lactobacillus*, are widely used. However, recent studies using metagenomic approaches have underlined the importance of commensal species in maintaining gut health and have helped to unravel many potential NGPs [27]. These include *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphalis*, *Bac-*

teroides fragilis, and some strains of *Clostridium* (Figure 1). Recently, other bacteria, such as *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium*, and *Propionibacterium freundenreichii*, have been shown to have beneficial effects [27–29].

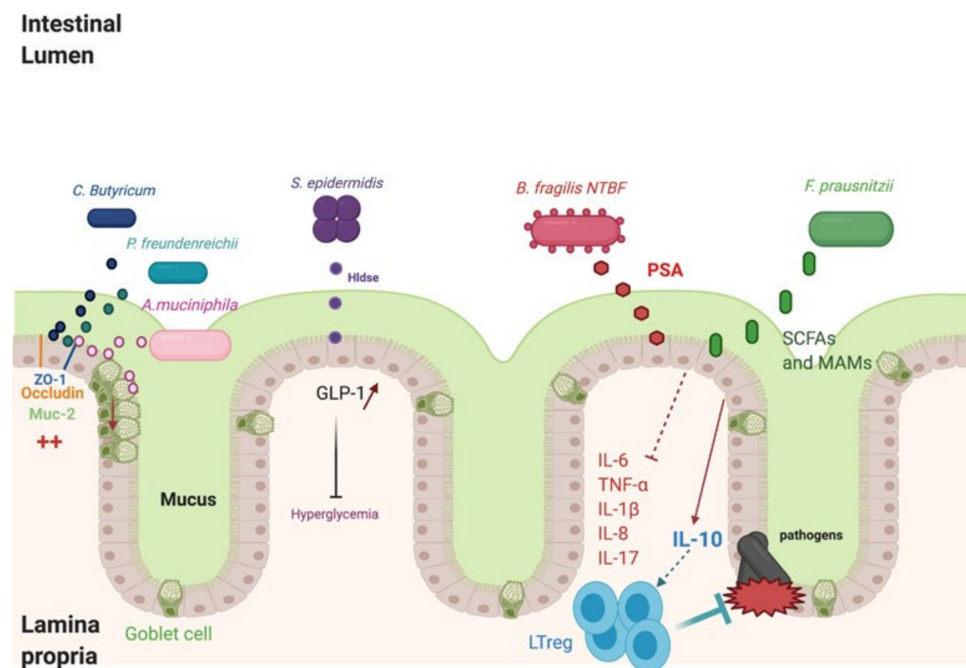


Figure 1. Impact of next-generation probiotics (NGPs) on intestinal epithelium. NGPs (non-toxinogenic *Bacteroides fragilis* (NTBF), *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermancia muciniphila*, *Clostridium Butyricum*, *Propionibacterium freundenreichii*, *Staphylococcus epidermidis*) produce different metabolites impacting the health of the gut and other organs. The derived metabolites, polysaccharide A (PSA) of NTBF strain and short-chain fatty acids (SCFAs) and microbial ant-inflammatory molecules (MAMs) of *Faecalibacterium prausnitzii*, inhibit inflammatory cytokines and increase interleukin-10 (IL-10). *Clostridium Butyricum*, *Propionibacterium freundenreichii*, and *Akkermancia muciniphila* act by increasing zonula occludens-1 (ZO-1) and occludin expression improving the intestinal barrier. *A. muciniphila* restores the number of Goblet cells, reversing intestinal mucosa damage and increasing the expression of mucin-2 (MUC-2). *Staphylococcus epidermidis* Hldse can induce glucagon-like peptide-1 (GLP-1) expression in epithelial cells, decreasing hyperglycemia. Figure created with BioRender.com (accessed on 19 May 2020).

4.1. *Faecalibacterium prausnitzii*

Faecalibacterium prausnitzii (*F. prausnitzii*) belongs to Firmicutes phylum, which is a Gram-positive bacterial group representing the majority of beneficial bacteria in the gut. Different in vitro studies have shown that it inhibits inflammation by decreasing inflammatory cytokines (tumor necrosis factor α (TNF α), and the interleukins, IL-1B, IL-6, and IL-8) and by increasing interleukin-10 (IL-10) [30]. Healthy effects were shown in mice by the inhibition of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression [31]. *F. prausnitzii* induced the dendritic cells to express a unique array of potent regulatory T-cell-polarizing molecules IL-10, IL-27, CD39, indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase (IDO-1), and programmed death-ligand 1 (PDL-1), and inhibited their up-regulation of costimulatory molecules as well as their production of pro-inflammatory cytokines IL-12 and TNF α [30]. In association with Toll-like receptors (TLR) 2 and TLR6 heterodimer, *F. prausnitzii* also inhibits TLR4 expression, causing the gut inflammation to decrease [30].

Importantly, several studies have shown that *F. prausnitzii* administration could be used to treat disease in other organs, could improve hepatic health, and reduces adipose tissue inflammation in the context of high-fat-diet or high-fat diet-fed mice [32]. Derived

from microbial anti-inflammatory molecules (MAMs), seven peptides were identified in the supernatant cultures of *F. Prausnitzii*. They have anti-inflammatory effects by inhibiting NF- κ B in vitro, decreasing the levels of inflammatory cytokines IL-5, IL-8, and IL-17, and increasing the IL-10 level. *F. prausnitzii* is also known to produce other metabolites, such as short-chain fatty acids (SCFA), which have beneficial effects on health [33]. This is consistent with another study showing that children with asthma showed a decrease in the colonization of *F. prausnitzii* [34].

Recent data have shown that there is a relationship among the diet, immune system, and intestinal microbiome [35]. It is known that not only diet influences the composition of the intestinal microbiota, but also the microbiota and their products have an effect on the host [29]. These studies have highlighted that inulin can have a positive effect on the level of *F. prausnitzii* [36,37]. Xylo-oligosaccharide (XOS) supplementation was also determined to increase *Faecalibacterium sp.* and *Akkermansia sp.* as well as bifidobacteria but did not have a significant impact on the levels of lactobacilli [38,39].

4.2. *Akkermansia muciniphila*

Verrucomicrobia phylum contains *Akkermansia muciniphila*, which is a Gram-negative strain. These bacteria are known as NGPs [40]. *Akkermansia muciniphila* has an impact on immunity modulation, metabolic disorders, and epithelial cell protection in the gut [41]. *A. muciniphila* helps to restore a healthy microbiota in the gut, decreases inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-12), and increases IL-10 cytokine [42]. *A. muciniphila* administration increases the expression of tight junction proteins, zonula occludens-1 (ZO-1) and occludin in vitro and in vivo [43]. Another particularity of *A. muciniphila* is the induction of mucus production and Goblets cell proliferation in the intestinal crypt [44]. Mucin-2 (MUC-2), which is expressed in the small intestine and colon, forms a layer of mucus on the intestine to inhibit the adhesion and invasion of pathogenic bacteria [45]. *A. muciniphila* increased the expression of MUC-2 and Trefoil factor 2 (Tff2), which was also shown in a previous report. Tff2 are stable secretory proteins which aid in epithelium recovery via stabilizing the mucus layer [44]. For other mucins, such as MUC5AC and MUC5B, which are mainly expressed in the lungs, there is no study showing an impact of *A. muciniphila* on their expression [46]. Indeed, MUC5AC overexpression in mice decreased influenza virus (PR8 (Puerto Rico/8)/H1N1) infections and neutrophil responses [47]. The mechanism of host regulation is thought to involve derived materials, including pili-like proteins [48]. The outer membrane pili-like protein of *A. muciniphila*, Amuc_1100, has been identified to activate intracellular signals mediated by the TLR2 of intestinal epithelial cells, contributing to the enhancement of the intestinal barrier [49]. Amuc_1100 also appears to be involved in the immune response, in particular in the induction of the production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine [49,50]. Additionally, the reduced abundance of *Akkermansia* in the intestinal tract has been linked with an enhanced risk of developing asthma [34].

However, *A. muciniphila* development is stimulated by polyphenols, which are considered as naturally existing substances in plants or obtained from foods (i.e., cereals, coffee, fruit, tea, vegetables, and wine). Derived from grapes, they act by increasing the abundance of *Akkermansia* in the intestinal tract; as a result, they have been shown to enhance intestinal barrier function and incretin secretion from intestinal endocrine cells. Cranberry administration has also been shown to enhance mucus secretion, which could create favorable conditions for *A. muciniphila*. The functionality of polyphenols has been deemed to contribute to the prevention of oxidative stress, which is a key solution for reducing the chronic pathologies associated with the establishment of dysbiosis. Hence, *A. muciniphila* and its Amuc_1100 proteins could be considered for the treatment of viral infection by inhibiting inflammation and stimulating mucus production.

4.3. *Bacteroides fragilis*

Bacteroidales are the most abundant families in the colon and are being studied as a potential NGP. One of them, the *Bacteroides fragilis* strain ZY-312, showed potentially health-promoting phenotypes when it was incubated with colonocytes and macrophages. *B. fragilis* is a Gram-negative anaerobic bacterium belonging to phylum Bacteroidetes that colonize naturally in the intestinal tract [51]. Some strains, such as Enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF), are toxic for the gut and cause diarrheal disease in children and adults [52]. The toxicity of these strains is caused by the presence of the pathogenicity island, BFPAl. The latter encodes *Bacteroides fragilis* toxin (BFT) responsible for diseases and colon cancer [53]. However, the major strains of *B. fragilis* are non-toxinogenic *B. fragilis* (NTBF), which are considered beneficial for health. The *B. fragilis* ATCC 25,285 strain can induce Foxp3+ Treg activation, increase the level of IL-10 secretion, and decrease the IL-17 cytokine level in BALB/c mice [54]. The administration of a high level of ZY-312 to antibiotics-associated disease (AAD) rats caused an increase in MUC-2, ZO-1, and occludin expression. Some strains of NTBF, such as *B. fragilis* ATCC 25,285, secreted polysaccharide A (PSA) identified as an immunomodulatory molecule. PSA can interact with TLR2 on dendritic cells (DCs), which process PSA to interact with T-cell receptors. This interaction induces an expansion of IL-10-producing CD4+ cells [52]. PSA may provide robust protective anti-inflammatory responses during viral infections. In a study analyzing Herpes simplex infection in a murine model, it was observed that the PSA-treated mice exhibited high survival rates as compared to controls, and decreased levels of inflammation [55]. A comparison with other mice showed that IL-10 was the main anti-inflammatory factor secreted by CD4+ and CD8+ T cells. PSA can also inhibit asthma, and inflammatory bowel disease (IBD). Exposure to PSA resulted in the upregulation and secretion of IFN γ , TNF α , IL-6, and CXCL10, consistent with an interferon responsive gene (IRG) signature [56].

4.4. The Emergence of Other Bacteria

Recently, some studies have suggested the emergence of other bacteria less known as probiotics. It was shown that *Clostridium butyricum* induced a decrease in inflammatory cytokines (IFN γ , TNF- α , IL-8, and IL-1 β) and an increase in ZO-1 and occludin expression [57]. Hldse peptide of *S. epidermidis* may improve diabetes by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) stimulation [58]. In addition, it was shown that *Propionibacterium freundenreichii* supernatant stimulated MUC-2 expression, decreased leucocyte infiltration and inflammation on Goblet cells, and decreased inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-1 β) [59].

Respiratory commensal bacteria may be a source for developing NGP. The bacteria of the nasal human mucosa, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, can be considered as a candidate to modulate respiratory immune responses and to fight against RSV [60]. In mice infected with RSV, *C. pseudodiphtheriticum* induces the secretion of IFN- β , TNF- α , IL-6, and IL-10, which may restrict inflammation during RSV infection and consequently reduces injury.

5. Probiotics Administration on Gut–Lung Axis in the Context of Respiratory Tract Infections

Different studies have described that the gut–lung axis is implicated in several diseases [61]. Some studies showed that lung diseases could be aggravated by gut microbiota disorder. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is induced by nutrient deficiency associated with the decrease in anti-inflammatory molecules secreted by healthy bacteria [62]. Cystic fibrosis (CF) could also be aggravated by gut microbiota disorder in children. The decrease in *Bacteroides* spp. was associated with an increase in IL-8 and inflammation in cystic fibrosis patients [63]. Segmented filamentous bacteria in the gut enhance T_H17/IL17A immune response and disrupt the immune homeostasis balance in the lungs. This leads to autoimmunity of rheumatoid arthritis (RA), which can generate lung complications in 59% of patients [64]. *Lachnospira* and *Clostridium neonatale* abundance is associated with asthma in children [65]. Additionally, a reduced abundance of *Akker-*

mansia, *Bifidobacteria*, and *Faecalibacteria* in the neonatal gut has been linked with a risk of developing asthma [34]. The intestinal microbiota not only modulate the balance of immunity in the gut but also in other organs.

Variations in the composition of the gut microbiota can lead to respiratory infections [61,66,67]. It was shown that avian H5N1 influenza A virus (IAV) decreased Bacteroidetes and increased Firmicutes seven days after infection. The depletion of the intestinal microbiota induced by IAV facilitates the invasion of bacterial pathogens [67]. Similarly, H7N9-infected patients showed a decreased microbial diversity in gut microbiota [68]. In human H7N9 infection, *F. prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., *Roseburia intestinalis*, and *Lactobacillus* spp. were decreased, whereas pathogenic *E. coli* and *Clostridium butyricum* were increased [69]. RSV infection in mice also altered the microbiota composition: Bacteroidetes increased and Firmicutes decreased. Respiratory tract infections can impact the immune response in the lungs by modulating gut microbiota. Yu et al. (2015) suggested that modification in the gut microbiota may down-regulate the immune recognition mechanisms in the lungs. As a result, immune response functions could not be exerted, reducing the ability to clear viruses from the lungs [70].

Notably, gut–lung communication is bidirectional [61]. Inflammatory bowel disease (IBD) causes lung damage by increasing inflammation, leading to changes in tomography, and promotes respiratory tract infection [71]. Additionally, oral antibiotic treatment in mice worsens influenza A infection, showing the importance of the microbiota for respiratory tract infection [71]. Another study showed that cystic fibrosis is responsible for disrupting the gut microbiota. This supports the relationship between the lungs and the intestine. Dumas et al. (2018) concluded that the administration of probiotics (intranasal or oral) improves immunity and lowers pulmonary viral levels. This supports the relationship between the lungs and the intestine [72].

The oral administration of NGPs during viral pulmonary infection could help prevent intestinal infection and dysbiosis. It also helps fight viral pulmonary infections by reducing inflammation or acting directly on the virus with circulating bacterial metabolites. The latter produced by the gut bacteria move through the bloodstream to modulate the immune response in distant organs [73]. These metabolites play a key factor in the dialogue between the gut microbiota and the lungs. They can be derived from ingested nutrients as they cannot be found in food or produced by mammalian cells. They enter the portal vein reaching the liver where they will be metabolized. Molecules that were not metabolized enter the peripheral circulation to reach distal body organs.

6. Probiotic-Derived Metabolites as Beneficial Mediators in Viral Infection?

Many studies showed that gut microbiota contain healthy bacteria and the supernatant of these NGPs could help to fight against diseases in the gut and other organs [74,75]. Using NGPs could allow the discovery of new molecules to fight against respiratory virus infections. Several factors have been shown to be implicated alongside the gut–lung axis, including systemic dissemination of bacterial-derived components and metabolic degradation products.

Indeed, the intestinal microbiota generate metabolites that include folate, indoles, Gamma-aminobutyric acid, serotonin, secondary bile acids, desaminotyrosine (DAT), and also SCFAs (Table 1). We discuss here three of these metabolites (butyrate, DAT, and secondary bile acids) and their potential usefulness in treating respiratory tract viral infection as COVID-19 (Figure 2).

Table 1. Next-generation or common probiotic-derived metabolites implicated in diseases.

Metabolites	Main Bacteria Responsible for Production	Respiratory Tract Infection or Other Pathology	Mode of Action	Reference
Short-chain fatty acids (SCFAs) Butyrate	<i>Faecalibacterium</i>	Lower respiratory tract infection Influenza virus	Regulate inflammation, promote monocytes, decrease neutrophils, maintain gut barrier function.	[76]
Desaminotyrosine (DAT)	<i>Clostridium orbiscindens</i>	Influenza virus H1N1	Inhibit virus replication (interferons), decrease lung immunopathology.	[77]
Secondary bile acid	<i>Bacteroides</i>	Influenza virus H5N1	Inhibit virus replication, has anti-inflammatory properties.	[78]
Folate	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	Gastric colorectal cancer	Involved in many metabolic pathways.	[79]
Indole derivatives	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Metabolic syndrome, Psychiatric diseases	Affect host intestinal inflammation.	[80]
Gut-derived Neuro-transmitters (Serotonin, GABA, Histamine)	<i>L. reuteri, Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	Depression Anxiety and depression Allergy	Regulate numerous physiological processes, inhibit neurotransmitter (GABA), have several roles in immune functions.	[81] [82] [83]
Microbial Anti-Inflammatory molecules (MAMs)	<i>F. prausnitzii</i>	Colitis	Have anti-inflammatory properties	[84]
Amuc_1100	<i>A. muciniphila</i>	Obesity	Regulate host immunological homeostasis, and improve of gut barrier function	[85,86]

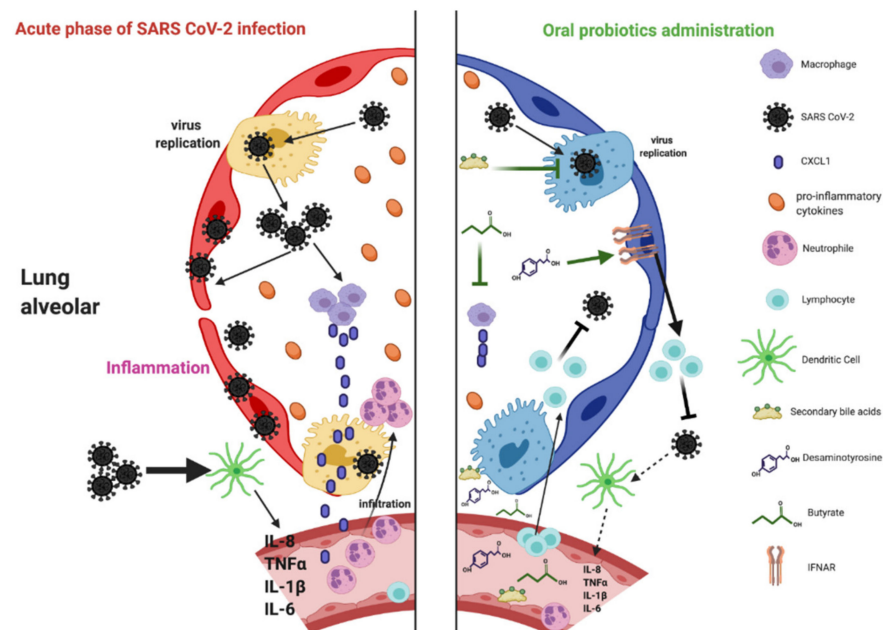


Figure 2. Model of the effect of next-generation probiotic (NGP)-derived metabolites on infected lungs. In the acute phase of SARS CoV-2 infection, inflammatory cytokines are secreted (storm cytokines), and airway debris and pulmonary edema, form leading to respiratory distress. After oral administration of NGPs, their metabolites are transported by the blood to the lungs where they can regulate the immune system or viral replication. Butyrate increases the proliferation of the macrophages that express a lower level of chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), thus reducing neutrophil influx in the lungs. Secondary bile acid metabolites directly affect CD4⁺ T cells or decrease progeny viruses. Desaminotyrosine (DAT) metabolites boost type I interferons (IFN) production by amplifying interferon- α/β receptor (IFNAR) and activator of transcription 1 (STAT1) and activate lymphocytes. Figure created with BioRender.com (accessed on 19 May 2020).

6.1. Butyrate

The most investigated bacterial metabolites are probably the SCFAs (ie, butyrate, propionate, and acetate). Several bacteria, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Akkermansia muciniphila*, and *Bacteroides* spp., produce acetate [87], whereas propionate is produced by *Roseburia inulinivorans*, *Bacteroides* spp., *Veillonella* spp., and *Salmonella* spp. [88]. *Roseburia* spp., *F. prausnitzii*, and *Eubacterium rectale* generate butyrate. It was shown that the gut microbiota and their metabolites, including SCFAs, can regulate host inflammation and modulate the immunity against pathogens. Butyrate is considered an immunomodulatory compound. Additionally, it works as an essential energy source, allowing colonic cells to proliferate and maintain healthy gut barrier function [89]. Patients with butyrate-producing bacteria were less likely to develop viral lower respiratory infection (LRTI) [76]. A study on mice suggested that butyrate, by inhibiting histone deacetylase, restores IL-10 in the lung [90]. Furthermore, butyrate contributes to the healthy status of distant organs such as the lungs. Butyrate or propionate promotes the increase in lymphocyte antigen 6C (Ly6C) monocytes in the lungs during influenza infection [91]. These monocytes differentiate into activated macrophages, expressing a lower level of neutrophil chemoattractant (CXCL1). Thus, the influx of neutrophils is decreased, resulting in a reduced pulmonary immunopathology mediated by influenza.

6.2. Desaminotyrosine (DAT)

Another microbial metabolite called desaminotyrosine (DAT) joined SCFAs in affecting pulmonary response. It was shown that DAT protects mice against the influenza virus. This was also confirmed by Steed et al. (2017) who demonstrated DAT protection against influenza and that it decreases lung immunopathology [77]. Furthermore, the gut bacteria, *Clostridium orbiscindens*, were shown to produce DAT that rescued antibiotic-treated influenza-infected mice. DAT production occurs during flavonoid metabolism in specific species [92]. Flavonoids are a group of structurally diverse, water-soluble, polyphenolic, plant-derived compounds found in nutritionally diverse foods, including apples, berries, tea, citrus, and red wine [93]. These flavonoids activate type I IFN secretion and protect against influenza by increasing interferon- α/β receptor (IFNAR) and signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) signaling [94].

6.3. Secondary Bile Acids

In the liver, cholesterol is transformed into primary bile acids, cholic acid (CA), and chenodeoxycholic acid (CDCA). CDCA was shown to inhibit some viruses, such as rotavirus [95]. Some in vitro studies also revealed that CDCA inhibits three different influenza A virus (IAV) strains, including the pathogenic H5N1 [78]. Treatment with CDCA resulted in a decrease in viruses both in infected A549 and MDCK cells. CDCA can block viral ribonucleoprotein (vRNP) nuclear export, impairing IAV replication in vitro [78].

Gut bacteria can convert CA and CDCA into secondary bile acids, deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LCA), and ursodeoxycholic acid (UDCA). *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, and *Ruminococcus* are the main gut bacteria involved in bile acid metabolism. Some studies have begun to reveal the anti-inflammatory roles of bile acids, particularly in the innate immune system. They suppress NF- κ B-dependent signaling pathways and inhibit NLRP3-dependent inflammasome activities [96]. Additionally, two CDCA-derived secondary bile acids, UCDA and hyodeoxycholic acid (HDCA), showed much weaker inhibitory activities against IAV. Additional anti-inflammatory roles for two distinct derivatives of LCA were revealed in both humans and rodents that directly affect CD4⁺ T cells: T helper cells expressing IL-17 (T_H17) cell differentiation are inhibited by 3-oxoLCA, whereas regulatory T-cell (T_{reg}) cell differentiation is enhanced by isoalloLCA [97].

7. Conclusions

At this time of the COVID-19 pandemic, when no pharmacological strategies for prevention or treatment are available, attention to alternative therapies using probiotics must be considered. Emerging data suggest that changes in the immune homeostasis, induced by SARS CoV-2, might be mediated by gut microbiota. Elderly people have less diverse intestinal flora in which beneficial microorganisms deteriorate [98]; this is in line with the observation that older individuals are more susceptible to SARS CoV-2 and more severe COVID-19 [99,100].

The structure and function of the intestinal flora could be a potential biological mechanism behind the diverse susceptibility of different groups of people to SARS CoV-2. The administration of these NGPs, isolated from the human gut, could restore the microbiota and improve the immunity in the lungs. Indeed, several studies have suggested a connection between the gut and the lungs. The interplay between these two organs may be based on soluble microbial metabolites transported via the circulation. The gut microbiota generate many diffusible metabolites that include secondary bile acids, DAT, and SCFAs.

NGPs can restore the immune response, either by correcting alterations of intestinal microbiota or by secreting metabolites that act in the lungs. Therefore, considering the potential beneficial impact of probiotics during respiratory viral infection, the possibility to use them as therapeutic agents during SARS CoV-2 infections should be considered. However, preclinical and clinical studies are needed to confirm the possible use of these NGPs or their metabolites in the fight against COVID-19.

Author Contributions: Conceptualization: L.B. and T.G. Writing—original draft preparation: T.G. and L.B.; Writing—review and editing: T.G., L.B., S.D.-L.G., A.S., Z.T.-S., A.J.-G. and O.L.; funding acquisition: O.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the INSERM, France.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank Michel Cormier who died from COVID-19 for his research and teaching in pharmaceutical microbiology.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Lai, C.-C.; Shih, T.-P.; Ko, W.-C.; Tang, H.-J.; Hsueh, P.-R. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Coronavirus Disease-2019 (COVID-19): The Epidemic and the Challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *55*, 105924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Qin, C.; Zhou, L.; Hu, Z.; Zhang, S.; Yang, S.; Tao, Y.; Xie, C.; Ma, K.; Shang, K.; Wang, W.; et al. Dysregulation of Immune Response in Patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **2020**. [[CrossRef](#)]
- Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, *395*, 497–506. [[CrossRef](#)]
- Zhang, R.; Wang, X.; Ni, L.; Di, X.; Ma, B.; Niu, S.; Liu, C.; Reiter, R.J. COVID-19: Melatonin as a Potential Adjuvant Treatment. *Life Sci.* **2020**, *250*, 117583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Luo, P.; Liu, Y.; Qiu, L.; Liu, X.; Liu, D.; Li, J. Tocilizumab Treatment in COVID-19: A Single Center Experience. *J. Med. Virol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gou, W.; Fu, Y.; Yue, L.; Chen, G.; Cai, X.; Shuai, M.; Xu, F.; Yi, X.; Chen, H.; Zhu, Y.; et al. Gut Microbiota May Underlie the Predisposition of Healthy Individuals to COVID-19. *medRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
- Kruglikov, I.L.; Shah, M.; Scherer, P.E. Obesity and Diabetes as Comorbidities for COVID-19: Underlying Mechanisms and the Role of Viral-Bacterial Interactions. *eLife* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)]
- Gu, S.; Chen, Y.; Wu, Z.; Chen, Y.; Gao, H.; Lv, L.; Guo, F.; Zhang, X.; Luo, R.; Huang, C.; et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients with COVID-19 or H1N1 Influenza. *Clin. Infect. Dis.* **2020**. [[CrossRef](#)]
- Xu, K.; Cai, H.; Shen, Y.; Ni, Q.; Chen, Y.; Hu, S.; Li, J.; Wang, H.; Yu, L.; Huang, H.; et al. Management of corona virus disease-19 (COVID-19): The Zhejiang experience. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **2020**, *49*, 147–157. [[CrossRef](#)]

10. Zuo, T.; Liu, Q.; Zhang, F.; Lui, G.C.-Y.; Tso, E.Y.; Yeoh, Y.K.; Chen, Z.; Boon, S.S.; Chan, F.K.; Chan, P.K.; et al. Depicting SARS-CoV-2 Faecal Viral Activity in Association with Gut Microbiota Composition in Patients with COVID-19. *Gut* **2021**, *70*, 276–284. [[CrossRef](#)]
11. Dhar, D.; Mohanty, A. Gut Microbiota and Covid-19- Possible Link and Implications. *Virus Res.* **2020**, *285*, 198018. [[CrossRef](#)]
12. Zuo, T.; Zhang, F.; Lui, G.C.Y.; Yeoh, Y.K.; Li, A.Y.L.; Zhan, H.; Wan, Y.; Chung, A.C.K.; Cheung, C.P.; Chen, N.; et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology* **2020**, *159*, 944–955. [[CrossRef](#)]
13. Yeoh, Y.K.; Zuo, T.; Lui, G.C.-Y.; Zhang, F.; Liu, Q.; Li, A.Y.; Chung, A.C.; Cheung, C.P.; Tso, E.Y.; Fung, K.S.; et al. Gut Microbiota Composition Reflects Disease Severity and Dysfunctional Immune Responses in Patients with COVID-19. *Gut* **2021**, *70*, 698–706. [[CrossRef](#)]
14. Sokol, H.; Contreras, V.; Maisonnasse, P.; Desmons, A.; Delache, B.; Sencio, V.; Machelart, A.; Brisebarre, A.; Humbert, L.; Deryuter, L.; et al. SARS-CoV-2 Infection in Nonhuman Primates Alters the Composition and Functional Activity of the Gut Microbiota. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1–19. [[CrossRef](#)]
15. Passiotti, M.; Maggina, P.; Megremis, S.; Papadopoulos, N.G. The Common Cold: Potential for Future Prevention or Cure. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2014**, *14*, 413. [[CrossRef](#)]
16. Lee, E.-S.; Song, E.-J.; Nam, Y.-D.; Lee, S.-Y. Probiotics in Human Health and Disease: From Nutraceuticals to Pharmabiotics. *J. Microbiol.* **2018**, *56*, 773–782. [[CrossRef](#)]
17. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hao, Q.; Dong, B.R.; Wu, T. Probiotics for Preventing Acute Upper Respiratory Tract Infections. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Vouloumanou, E.K.; Makris, G.C.; Karageorgopoulos, D.E.; Falagas, M.E. Probiotics for the Prevention of Respiratory Tract Infections: A Systematic Review. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *34*, 197.e1–197.e10. [[CrossRef](#)]
20. Long, J.D.; Morris, A. Probiotics in Preventing Acute Upper Respiratory Tract Infections. *Am. J. Nurs.* **2017**, *117*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Weizman, Z.; Asli, G.; Alsheikh, A. Effect of a Probiotic Infant Formula on Infections in Child Care Centers: Comparison of Two Probiotic Agents. *Pediatrics* **2005**, *115*, 5–9. [[CrossRef](#)]
22. Belkacem, N.; Serafini, N.; Wheeler, R.; Derrien, M.; Boucinha, L.; Couesnon, A.; Cerf-Bensussan, N.; Gomperts Boneca, I.; Di Santo, J.P.; Taha, M.-K.; et al. Lactobacillus Paracasei Feeding Improves Immune Control of Influenza Infection in Mice. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Jung, Y.-J.; Lee, Y.-T.; Ngo, V.L.; Cho, Y.-H.; Ko, E.-J.; Hong, S.-M.; Kim, K.-H.; Jang, J.-H.; Oh, J.-S.; Park, M.-K.; et al. Heat-Killed Lactobacillus Casei Confers Broad Protection against Influenza A Virus Primary Infection and Develops Heterosubtypic Immunity against Future Secondary Infection. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ruiz, L.; Delgado, S.; Ruas-Madiedo, P.; Sánchez, B.; Margolles, A. Bifidobacteria and Their Molecular Communication with the Immune System. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wong, C.B.; Odamaki, T.; Xiao, J. Beneficial Effects of Bifidobacterium Longum Subsp. Longum BB536 on Human Health: Modulation of Gut Microbiome as the Principal Action. *J. Funct. Foods* **2019**, *54*, 506–519. [[CrossRef](#)]
26. Mahooti, M.; Abdolalipour, E.; Salehzadeh, A.; Mohebbi, S.R.; Gorji, A.; Ghaemi, A. Immunomodulatory and Prophylactic Effects of Bifidobacterium Bifidum Probiotic Strain on Influenza Infection in Mice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. O’Toole, P.W.; Marchesi, J.R.; Hill, C. Next-Generation Probiotics: The Spectrum from Probiotics to Live Biotherapeutics. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Chang, C.-J.; Lin, T.-L.; Tsai, Y.-L.; Wu, T.-R.; Lai, W.-F.; Lu, C.-C.; Lai, H.-C. Next Generation Probiotics in Disease Amelioration. *J. Food Drug Anal.* **2019**, *27*, 615–622. [[CrossRef](#)]
29. Lordan, C.; Thapa, D.; Ross, R.P.; Cotter, P.D. Potential for Enriching Next-Generation Health-Promoting Gut Bacteria through Prebiotics and Other Dietary Components. *Gut Microbes* **2020**, *11*, 1–20. [[CrossRef](#)]
30. Alameddine, J.; Godefroy, E.; Papargyris, L.; Sarrabayrouse, G.; Tabiasco, J.; Bridonneau, C.; Yazdanbakhsh, K.; Sokol, H.; Altare, F.; Jotereau, F. Faecalibacterium Prausnitzii Skews Human DC to Prime IL10-Producing T Cells Through TLR2/6/JNK Signaling and IL-10, IL-27, CD39, and IDO-1 Induction. *Front. Immunol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
31. Roychowdhury, S.; Cadnum, J.; Glueck, B.; Obrenovich, M.; Donskey, C.; Cresci, G.A.M. Faecalibacterium Prausnitzii and a Prebiotic Protect Intestinal Health in a Mouse Model of Antibiotic and Clostridium Difficile Exposure. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **2018**, *42*, 1156–1167. [[CrossRef](#)]
32. Munukka, E.; Rintala, A.; Toivonen, R.; Nylund, M.; Yang, B.; Takanen, A.; Hänninen, A.; Vuopio, J.; Huovinen, P.; Jalkanen, S.; et al. Faecalibacterium Prausnitzii Treatment Improves Hepatic Health and Reduces Adipose Tissue Inflammation in High-Fat Fed Mice. *ISME J.* **2017**, *11*, 1667–1679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Savin, K.W.; Zawadzki, J.; Auld, M.J.; Wang, J.; Ram, D.; Rochfort, S.; Cocks, B.G. Faecalibacterium Diversity in Dairy Cow Milk. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0221055. [[CrossRef](#)]

34. Fujimura, K.E.; Sitarik, A.R.; Havstad, S.; Lin, D.L.; Levan, S.; Fadrosch, D.; Panzer, A.R.; LaMere, B.; Rackaityte, E.; Lukacs, N.W.; et al. Neonatal Gut Microbiota Associates with Childhood Multisensitized Atopy and T Cell Differentiation. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1187–1191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hu, J.; Zhang, L.; Lin, W.; Tang, W.; Chan, F.K.L.; Ng, S.C. Review Article: Probiotics, Prebiotics and Dietary Approaches during COVID-19 Pandemic. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *108*, 187–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ramirez-Farias, C.; Slezak, K.; Fuller, Z.; Duncan, A.; Holtrop, G.; Louis, P. Effect of Inulin on the Human Gut Microbiota: Stimulation of *Bifidobacterium Adolescentis* and *Faecalibacterium Prausnitzii*. *Br. J. Nutr.* **2009**, *101*, 541–550. [[CrossRef](#)]
37. Nogacka, A.M.; Salazar, N.; Arboleya, S.; Ruas-Madiedo, P.; Mancabelli, L.; Suarez, A.; Martinez-Faedo, C.; Ventura, M.; Tochio, T.; Hirano, K.; et al. In Vitro Evaluation of Different Prebiotics on the Modulation of Gut Microbiota Composition and Function in Morbid Obese and Normal-Weight Subjects. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 906. [[CrossRef](#)]
38. Finegold, S.M.; Li, Z.; Summanen, P.H.; Downes, J.; Thames, G.; Corbett, K.; Dowd, S.; Krak, M.; Heber, D. Xylooligosaccharide Increases *Bifidobacteria* but Not *Lactobacilli* in Human Gut Microbiota. *Food Funct.* **2014**, *5*, 436–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lensu, S.; Pariyani, R.; Mäkinen, E.; Yang, B.; Saleem, W.; Munukka, E.; Lehti, M.; Driuchina, A.; Lindén, J.; Tirola, M.; et al. Prebiotic Xylo-Oligosaccharides Ameliorate High-Fat-Diet-Induced Hepatic Steatosis in Rats. *Nutrients* **2020**, *12*, 3225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Zhang, T.; Li, Q.; Cheng, L.; Buch, H.; Zhang, F. *Akkermansia muciniphila* Is a Promising Probiotic. *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 1109–1125. [[CrossRef](#)]
41. Ansaldo, E.; Slayden, L.C.; Ching, K.L.; Koch, M.A.; Wolf, N.K.; Plichta, D.R.; Brown, E.M.; Graham, D.B.; Xavier, R.J.; Moon, J.J.; et al. *Akkermansia muciniphila* Induces Intestinal Adaptive Immune Responses during Homeostasis. *Science* **2019**, *364*, 1179–1184. [[CrossRef](#)]
42. Bian, X.; Wu, W.; Yang, L.; Lv, L.; Wang, Q.; Li, Y.; Ye, J.; Fang, D.; Wu, J.; Jiang, X.; et al. Administration of *Akkermansia muciniphila* Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
43. Ashrafian, F.; Shahriary, A.; Behrouzi, A.; Moradi, H.R.; Keshavarz Azizi Raftar, S.; Lari, A.; Hadifar, S.; Yaghoubar, R.; Ahmadi Badi, S.; Khatami, S.; et al. *Akkermansia muciniphila*-Derived Extracellular Vesicles as a Mucosal Delivery Vector for Amelioration of Obesity in Mice. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
44. Zhu, L.; Lu, X.; Liu, L.; Voglmeir, J.; Zhong, X.; Yu, Q. *Akkermansia muciniphila* Protects Intestinal Mucosa from Damage Caused by *S. Pullorum* by Initiating Proliferation of Intestinal Epithelium. *Vet. Res.* **2020**, *51*. [[CrossRef](#)]
45. Quintana-Hayashi, M.; Padra, M.; Padra, J.; Benktander, J.; Lindén, S. Mucus-Pathogen Interactions in the Gastrointestinal Tract of Farmed Animals. *Microorganisms* **2018**, *6*, 55. [[CrossRef](#)]
46. Ridley, C.; Thornton, D.J. Mucins: The Frontline Defence of the Lung. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *46*, 1099–1106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ehre, C.; Worthington, E.N.; Liesman, R.M.; Grubb, B.R.; Barbier, D.; O’Neal, W.K.; Sallenave, J.-M.; Pickles, R.J.; Boucher, R.C. Overexpressing Mouse Model Demonstrates the Protective Role of Muc5ac in the Lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16528–16533. [[CrossRef](#)]
48. Ottman, N.; Geerlings, S.Y.; Aalvink, S.; de Vos, W.M.; Belzer, C. Action and Function of *Akkermansia muciniphila* in Microbiome Ecology, Health and Disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2017**, *31*, 637–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Plovier, H.; Everard, A.; Druart, C.; Depommier, C.; Van Hul, M.; Geurts, L.; Chilloux, J.; Ottman, N.; Duparc, T.; Lichtenstein, L.; et al. A Purified Membrane Protein from *Akkermansia muciniphila* or the Pasteurized Bacterium Improves Metabolism in Obese and Diabetic Mice. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 107–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Wang, J.; Xiang, R.; Wang, R.; Zhang, B.; Gong, W.; Zhang, J.; Zhang, M.; Wang, M. The Variable Oligomeric State of Amuc_1100 from *Akkermansia muciniphila*. *J. Struct. Biol.* **2020**, *212*, 107593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Sun, F.; Zhang, Q.; Zhao, J.; Zhang, H.; Zhai, Q.; Chen, W. A Potential Species of Next-Generation Probiotics? The Dark and Light Sides of *Bacteroides Fragilis* in Health. *Food Res. Int.* **2019**, *126*, 108590. [[CrossRef](#)]
52. Zhang, W.; Zhu, B.; Xu, J.; Liu, Y.; Qiu, E.; Li, Z.; Li, Z.; He, Y.; Zhou, H.; Bai, Y.; et al. *Bacteroides Fragilis* Protects against Antibiotic-Associated Diarrhea in Rats by Modulating Intestinal Defenses. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
53. Casterline, B.W.; Hecht, A.L.; Choi, V.M.; Bubeck Wardenburg, J. The *Bacteroides Fragilis* Pathogenicity Island Links Virulence and Strain Competition. *Gut Microbes* **2017**, *8*, 374–383. [[CrossRef](#)]
54. Round, J.L.; Mazmanian, S.K. Inducible Foxp3+ Regulatory T-Cell Development by a Commensal Bacterium of the Intestinal Microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 12204–12209. [[CrossRef](#)]
55. Ramakrishna, C.; Kujawski, M.; Chu, H.; Li, L.; Mazmanian, S.K.; Cantin, E.M. *Bacteroides Fragilis* Polysaccharide A Induces IL-10 Secreting B and T Cells That Prevent Viral Encephalitis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2153. [[CrossRef](#)]
56. Alvarez, C.A.; Jones, M.B.; Hambor, J.; Cobb, B.A. Characterization of Polysaccharide A Response Reveals Interferon Responsive Gene Signature and Immunomodulatory Marker Expression. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 556813. [[CrossRef](#)]
57. Zhao, X.; Yang, J.; Ju, Z.; Wu, J.; Wang, L.; Lin, H.; Sun, S. *Clostridium Butyricum* Ameliorates *Salmonella* Enteritis Induced Inflammation by Enhancing and Improving Immunity of the Intestinal Epithelial Barrier at the Intestinal Mucosal Level. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
58. Tomaro-Duchesneau, C.; LeValley, S.L.; Roeth, D.; Sun, L.; Horrigan, F.T.; Kalkum, M.; Hyser, J.M.; Britton, R.A. Discovery of a Bacterial Peptide as a Modulator of GLP-1 and Metabolic Disease. *Sci. Rep.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]

59. Ma, S.; Yeom, J.; Lim, Y.-H. Dairy Propionibacterium Freudenreichii Ameliorates Acute Colitis by Stimulating MUC2 Expression in Intestinal Goblet Cell in a DSS-Induced Colitis Rat Model. *Sci. Rep.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Kanmani, P.; Clua, P.; Vizoso-Pinto, M.G.; Rodriguez, C.; Alvarez, S.; Melnikov, V.; Takahashi, H.; Kitazawa, H.; Villena, J. Respiratory Commensal Bacteria *Corynebacterium Pseudodiphtheriticum* Improves Resistance of Infant Mice to Respiratory Syncytial Virus and Streptococcus Pneumoniae Superinfection. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
61. Zhang, D.; Li, S.; Wang, N.; Tan, H.-Y.; Zhang, Z.; Feng, Y. The Cross-Talk Between Gut Microbiota and Lungs in Common Lung Diseases. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 301. [[CrossRef](#)]
62. Vaughan, A.; Frazer, Z.A.; Hansbro, P.M.; Yang, I.A. COPD and the Gut-Lung Axis: The Therapeutic Potential of Fibre. *J. Thorac. Dis.* **2019**, *11*, S2173–S2180. [[CrossRef](#)]
63. Antosca, K.M.; Chernikova, D.A.; Price, C.E.; Ruoff, K.L.; Li, K.; Guill, M.F.; Sontag, N.R.; Morrison, H.G.; Hao, S.; Drumm, M.L.; et al. Altered Stool Microbiota of Infants with Cystic Fibrosis Shows a Reduction in Genera Associated with Immune Programming from Birth. *J. Bacteriol.* **2019**, 201. [[CrossRef](#)]
64. Bradley, C.P.; Teng, F.; Felix, K.M.; Sano, T.; Naskar, D.; Block, K.E.; Huang, H.; Knox, K.S.; Littman, D.R.; Wu, H.-J.J. Segmented Filamentous Bacteria Provoke Lung Autoimmunity by Inducing Gut-Lung Axis Th17 Cells Expressing Dual TCRs. *Cell Host Microbe* **2017**, *22*, 697–704.e4. [[CrossRef](#)]
65. Hufnagl, K.; Pali-Schöll, I.; Roth-Walter, F.; Jensen-Jarolim, E. Dysbiosis of the Gut and Lung Microbiome Has a Role in Asthma. *Semin. Immunopathol.* **2020**, *42*, 75–93. [[CrossRef](#)]
66. Hanada, S.; Pirezadeh, M.; Carver, K.Y.; Deng, J.C. Respiratory Viral Infection-Induced Microbiome Alterations and Secondary Bacterial Pneumonia. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
67. Yildiz, S.; Mazel-Sanchez, B.; Kandasamy, M.; Manicassamy, B.; Schmolke, M. Influenza A Virus Infection Impacts Systemic Microbiota Dynamics and Causes Quantitative Enteric Dysbiosis. *Microbiome* **2018**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Qin, N.; Zheng, B.; Yao, J.; Guo, L.; Zuo, J.; Wu, L.; Zhou, J.; Liu, L.; Guo, J.; Ni, S.; et al. Influence of H7N9 Virus Infection and Associated Treatment on Human Gut Microbiota. *Sci. Rep.* **2015**, *5*. [[CrossRef](#)]
69. Wang, B.; Yao, M.; Lv, L.; Ling, Z.; Li, L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* **2017**, *3*, 71–82. [[CrossRef](#)]
70. Yu, B.; Dai, C.; Chen, J.; Deng, L.; Wu, X.; Wu, S.; Zhao, C.; Jiang, Z.; Chen, X. Dysbiosis of Gut Microbiota Induced the Disorder of Helper T Cells in Influenza Virus-Infected Mice. *Hum. Vaccines Immunother.* **2015**, *11*, 1140–1146. [[CrossRef](#)]
71. Ichinohe, T.; Pang, I.K.; Kumamoto, Y.; Peaper, D.R.; Ho, J.H.; Murray, T.S.; Iwasaki, A. Microbiota Regulates Immune Defense against Respiratory Tract Influenza A Virus Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 5354–5359. [[CrossRef](#)]
72. Dumas, A.; Bernard, L.; Poquet, Y.; Lugo-Villarino, G.; Neyrolles, O. The Role of the Lung Microbiota and the Gut-Lung Axis in Respiratory Infectious Diseases. *Cell. Microbiol.* **2018**, *20*, e12966. [[CrossRef](#)]
73. Anand, S.; Mande, S.S. Diet, Microbiota and Gut-Lung Connection. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Postler, T.S.; Ghosh, S. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 110–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Sittipo, P.; Shim, J.; Lee, Y. Microbial Metabolites Determine Host Health and the Status of Some Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5296. [[CrossRef](#)]
76. Haak, B.W.; Littmann, E.R.; Chaubard, J.-L.; Pickard, A.J.; Fontana, E.; Adhi, F.; Gyaltsen, Y.; Ling, L.; Morjaria, S.M.; Peled, J.U.; et al. Impact of Gut Colonization with Butyrate Producing Microbiota on Respiratory Viral Infection Following Allo-HCT. *Blood* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Steed, A.L.; Christophi, G.P.; Kaiko, G.E.; Sun, L.; Goodwin, V.M.; Jain, U.; Esaulova, E.; Artyomov, M.N.; Morales, D.J.; Holtzman, M.J.; et al. The Microbial Metabolite Desaminotyrosine Protects from Influenza through Type I Interferon. *Science* **2017**, *357*, 498–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Luo, L.; Han, W.; Du, J.; Yang, X.; Duan, M.; Xu, C.; Zeng, Z.; Chen, W.; Chen, J. Chenodeoxycholic Acid from Bile Inhibits Influenza A Virus Replication via Blocking Nuclear Export of Viral Ribonucleoprotein Complexes. *Molecules* **2018**, *23*, 3315. [[CrossRef](#)]
79. LeBlanc, J.G.; Milani, C.; de Giori, G.S.; Sesma, F.; van Sinderen, D.; Ventura, M. Bacteria as Vitamin Suppliers to Their Host: A Gut Microbiota Perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 160–168. [[CrossRef](#)]
80. Konopelski, P.; Ufnal, M. Indoles—Gut Bacteria Metabolites of Tryptophan with Pharmacotherapeutic Potential. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19*, 883–890. [[CrossRef](#)]
81. Xie, R.; Jiang, P.; Lin, L.; Jiang, J.; Yu, B.; Rao, J.; Liu, H.; Wei, W.; Qiao, Y. Oral Treatment with *Lactobacillus Reuteri* Attenuates Depressive-like Behaviors and Serotonin Metabolism Alterations Induced by Chronic Social Defeat Stress. *J. Psychiatr. Res.* **2020**, *122*, 70–78. [[CrossRef](#)]
82. Bravo, J.A.; Forsythe, P.; Chew, M.V.; Escaravage, E.; Savignac, H.M.; Dinan, T.G.; Bienenstock, J.; Cryan, J.F. Ingestion of *Lactobacillus* Strain Regulates Emotional Behavior and Central GABA Receptor Expression in a Mouse via the Vagus Nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16050–16055. [[CrossRef](#)]
83. Levy, M.; Thaïss, C.A.; Elinav, E. Metabolites: Messengers between the Microbiota and the Immune System. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 1589–1597. [[CrossRef](#)]
84. Breyner, N.M.; Michon, C.; de Sousa, C.S.; Vilas Boas, P.B.; Chain, F.; Azevedo, V.A.; Langella, P.; Chatel, J.M. Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium Prausnitzii* Shows a Protective Effect on DNBS and DSS-Induced Colitis Model in Mice through Inhibition of NF- κ B Pathway. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]

85. Cani, P.D.; de Vos, W.M. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1765. [[CrossRef](#)]
86. Ottman, N.; Reunanen, J.; Meijerink, M.; Pietilä, T.E.; Kainulainen, V.; Klievink, J.; Huuskonen, L.; Aalvink, S.; Skurnik, M.; Boeren, S.; et al. Pili-like Proteins of *Akkermansia muciniphila* Modulate Host Immune Responses and Gut Barrier Function. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173004. [[CrossRef](#)]
87. Fernández, J.; Redondo-Blanco, S.; Gutiérrez-del-Río, I.; Miguélez, E.M.; Villar, C.J.; Lombó, F. Colon Microbiota Fermentation of Dietary Prebiotics towards Short-Chain Fatty Acids and Their Roles as Anti-Inflammatory and Antitumour Agents: A Review. *J. Funct. Foods* **2016**, *25*, 511–522. [[CrossRef](#)]
88. Koh, A.; De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Bäckhed, F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **2016**, *165*, 1332–1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Zheng, L.; Kelly, C.J.; Battista, K.D.; Schaefer, R.; Lanis, J.M.; Alexeev, E.E.; Wang, R.X.; Onyiah, J.C.; Kominsky, D.J.; Colgan, S.P. Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor-Dependent Repression of Claudin-2. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 2976–2984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Chakraborty, K.; Raundhal, M.; Chen, B.B.; Morse, C.; Tyurina, Y.Y.; Khare, A.; Oriss, T.B.; Huff, R.; Lee, J.S.; St Croix, C.M.; et al. The Mito-DAMP Cardiolipin Blocks IL-10 Production Causing Persistent Inflammation during Bacterial Pneumonia. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 13944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Dang, A.T.; Marsland, B.J. Microbes, Metabolites, and the Gut–Lung Axis. *Mucosal Immunol.* **2019**, *12*, 843–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Murota, K.; Nakamura, Y.; Uehara, M. Flavonoid Metabolism: The Interaction of Metabolites and Gut Microbiota. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2018**, *82*, 600–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: An Overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
94. Lobel, L.; Garrett, W.S. Take DAT, Flu! *Immunity* **2017**, *47*, 400–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Kim, Y.; Chang, K.-O. Inhibitory Effects of Bile Acids and Synthetic Farnesoid X Receptor Agonists on Rotavirus Replication. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12570–12577. [[CrossRef](#)]
96. Guo, C.; Xie, S.; Chi, Z.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhang, L.; Zheng, M.; Zhang, X.; Xia, D.; Ke, Y.; et al. Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *Immunity* **2016**, *45*, 944. [[CrossRef](#)]
97. Hang, S.; Paik, D.; Yao, L.; Kim, E.; Trinath, J.; Lu, J.; Ha, S.; Nelson, B.N.; Kelly, S.P.; Wu, L.; et al. Bile Acid Metabolites Control TH17 and Treg Cell Differentiation. *Nature* **2019**, *576*, 143–148. [[CrossRef](#)]
98. Nagpal, R.; Mainali, R.; Ahmadi, S.; Wang, S.; Singh, R.; Kavanagh, K.; Kitzman, D.W.; Kushugulova, A.; Marotta, F.; Yadav, H. Gut Microbiome and Aging: Physiological and Mechanistic Insights. *Nutr. Healthy Aging* **2018**, *4*, 267–285. [[CrossRef](#)]
99. Goyal, P.; Choi, J.J.; Pinheiro, L.C.; Schenck, E.J.; Chen, R.; Jabri, A.; Satlin, M.J.; Campion, T.R.; Nahid, M.; Ringel, J.B.; et al. Clinical Characteristics of Covid-19 in New York City. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 2372–2374. [[CrossRef](#)]
100. Lake, M.A. What We Know so Far: COVID-19 Current Clinical Knowledge and Research. *Clin. Med.* **2020**, *20*, 124–127. [[CrossRef](#)]

III) Les métabolites produits par *Bacteroides fragilis* inhibent la virulence et la persistance de *Salmonella*

Au sein de l'intestin, le microbiote intestinal protège l'épithélium intestinal contre les bactéries pathogènes. Il existe deux catégories de mécanismes d'action : (i) l'interaction directe, certaines bactéries commensales vont rentrer en compétition avec les bactéries décrites pathogènes ou pathogènes opportunistes, au niveau des nutriments et de la localisation dans l'intestin, (ii) l'interaction indirecte, quant à elle, consiste en un renforcement des mécanismes de défenses des cellules intestinales, induites par certaines bactéries commensales (358).

Parmi les mécanismes d'interactions directes, les bactéries commensales peuvent produire des bactériocines, qui induisent la mort de certaines espèces bactériennes, permettant de réguler la croissance des espèces bactériennes qui prolifèrent. Ainsi, certaines souches commensales de l'espèce *E. coli*, produisent des bactériocines qui régulent la croissance de la bactérie pathogène *E. coli* entérohémorragique (EHEC) (359). Il existe deux classes de bactériocines, la bactériocine de type A produite par les bactéries à Gram positif et la bactériocine de type B produit par les bactéries à Gram négatif (360). Parmi les bactériocines de type A, la zoocin A, la lysotaphine et l'helveticin J et V, produites par *Lactobacillus*, ont des activités antibactériennes liées à une activité d'endopeptidase, conduisant à la rupture de la membrane des bactéries Gram négatif (361,362). Parmi les bactériocines de type B, la pyocine produit par *Pseudomonas aeruginosa* induit la formation de pores dans la membrane des bactéries Gram+ conduisant à la mort bactérienne (363). Ces bactériocines permettent de réguler la population bactérienne dans l'intestin.

Dans le cas de dysbioses, certaines bactéries commensales sont souvent diminuées tandis que les bactéries pathogènes opportunistes sont augmentées. L'infection et la persistance de bactéries pathogènes comme *Salmonella* sont corrélées à l'apparition de CRC et les MICI (144,145,158,161,175), tandis que l'espèce bactérienne commensale *B. fragilis* NTBF est diminuée (171,195,304). Devant ce constat, nous nous sommes demandés si la diminution de *B. fragilis* NTBF est à l'origine de la présence de *Salmonella* dans la *lamina propria*, dans les cas de pathologies chroniques de l'intestin.

Pour répondre à cette question nous avons suivi plusieurs étapes :

Etape 1) Effet de *B. fragilis* sur la translocation de *S. Heidelberg* dans un modèle intestinal

in vitro

Pour étudier les interactions entre ces deux bactéries, deux souches bactériennes ont été sélectionnées : *Bacteroides fragilis* NTCC 9343 un potentiel PNG diminué dans les pathologies intestinales et *Salmonella* Heidelberg B182 HM, représentant une espèce bactérienne pathogène (91). Pour étudier leurs interactions, un modèle *in vitro* permettant d'étudier le phénomène de translocation de *S. Heidelberg* a été sélectionné. Dans un premier temps, un modèle tri-cellulaire, mimant l'épithélium intestinal *in vitro* comprenant des entérocytes, des cellules M et des cellules de Gobelet, a alors été utilisé (figure 24).

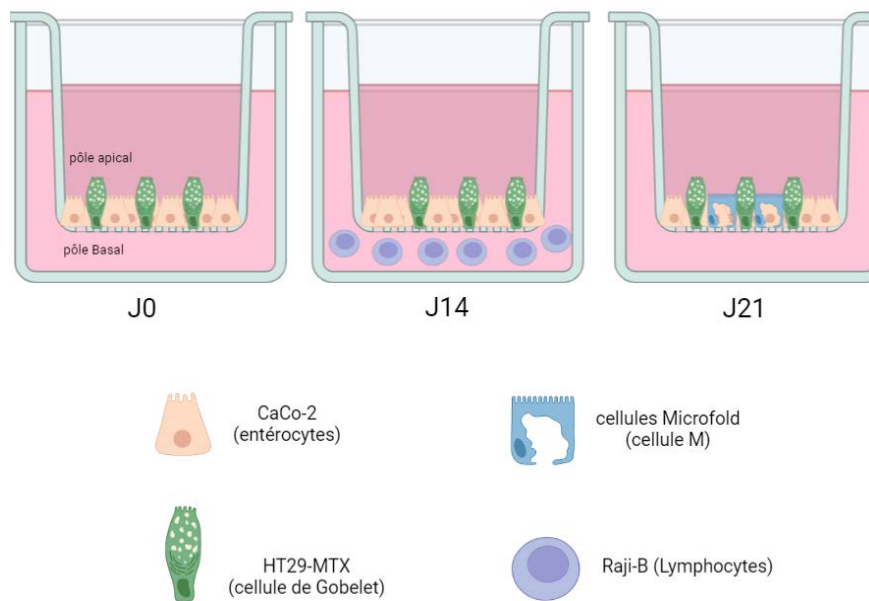


Figure 24 : Mise en place du modèle tri-cellulaire. Les cellules CaCo-2 (entérocytes) et cellules HT29-MTX (cellule de Gobelet), sont ajoutées dans le pôle apical (lumière intestinale) des inserts Transwell®. Après 14 jours de culture, les cellules CaCo-2 et HT29-MTX se sont développées dans le pôle apical. Les cellules Raji-B (lymphocytes) sont ajoutées dans le pôle basal. Les Raji-B sécrètent des médiateurs, permettant la différenciation de certaines CaCo-2 en cellules M. Après 21 jours de culture, les Raji-B sont enlevées du pôle basal (*lamina propria*) et certains entérocytes se sont différenciés en cellule M, formant ainsi un modèle tri-cellulaire (Figure créée à partir de Biorender).

Les différentes lignées cellulaires ont été ajoutées sur un insert Transwell, ce qui a permis la création d'un pôle apical, représentant la lumière intestinale, et d'un pôle basal, représentant la *lamina propria*. Ce système a servi d'outil pour analyser la translocation de *S. Heidelberg*, phénomène qui permet à *S. Heidelberg*, grâce à des effecteurs spécifiques, son passage de la lumière intestinale vers la *lamina propria*, pour se disséminer ensuite dans l'organisme. Sur le modèle tri-cellulaire, la translocation correspond au passage de *Salmonella*, du pôle apical vers le pôle basal.

Pour étudier l'impact de *B. fragilis* sur *S. Heidelberg*, une co-culture des bactéries, sur le modèle tri-cellulaire a été effectuée pendant trois heures. La translocation a été évaluée par numération de *S. Heidelberg* dans le compartiment apical et basal. Les premiers résultats ont révélé que *B. fragilis* et son surnageant étaient capables d'inhiber de manière très significative la

translocation de *S. Heidelberg*, sans pour autant inhiber la croissance bactérienne (91). Ces résultats signifient que les molécules produites par *B. fragilis* pourraient avoir un effet sur la virulence de *S. Heidelberg*.

Etape 2) Etude de l'impact des fractions du surnageant de *B. fragilis* sur la translocation de *S. Heidelberg*

Afin de compléter ces premiers résultats, une caractérisation du surnageant de *B. fragilis* a été réalisée, afin d'identifier les métabolites impliqués dans l'inhibition de la virulence de *S. Heidelberg* et les mécanismes mis en jeu. Pour répondre à cette problématique, le surnageant de *B. fragilis* a été fractionné par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). Six fractions du surnageant ont été récupérées, puis testées pour étudier leurs capacités à inhiber la translocation de *S. Heidelberg in vitro*, en utilisant le modèle tri-cellulaire. Deux fractions actives (F3 et F4) contre la virulence de *S. Heidelberg* ont été identifiées.

Etape 3) Etude de l'impact des fractions actives de *B. fragilis* sur la translocation de *S. Heidelberg* dans un modèle murin *in vivo*

Pour confirmer les observations *in vitro*, *S. Heidelberg* a été administrée dans un modèle murin en présence des fractions actives (mélange contenant les deux fractions actives F3 et F4). Après une semaine d'infection, la dissémination de *S. Heidelberg* a été étudiée dans le colon, les fèces, les PdPs, la rate et le foie. Cette dissémination est fortement réduite chez les souris infectées par *S. Heidelberg* et lorsqu'elles ont été traitées avec les fractions actives, dans les PdPs et la rate.

Les infections à *Salmonella in vivo* entraînent un profil d'augmentation des cytokines, qui leur est propre (364–366). En effet, une infection à *Salmonella* induit chez l'hôte une augmentation de la production des cytokines de phase aiguë de l'inflammation : l'IL-6, l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL17- α . *Salmonella*

est capable d'infecter les cellules intestinales et les macrophages. Cette faculté induit une réponse chez l'hôte, augmentant la production des cytokines IFN- γ et IL12p70, spécialisées dans la réponse intracellulaire. Une réponse impliquant les macrophages est également visible, par une augmentation de la sécrétion de la chimiokine « monocyte chemoattractant protein 1 » (MCP-1), spécialisée dans le recrutement des macrophages. Le facteur « granulocyte macrophage colony stimulating factor » (GM-CSF), qui a pour rôle la différenciation des monocytes en macrophages, est également augmentée en présence d'une infection à *Salmonella*.

Les résultats observés ont montré que chez les souris infectées par *S. Heidelberg* et traitées par les fractions actives, il y avait une diminution des infiltrats de neutrophiles dans le côlon, corrélée à une diminution du taux de cytokines pro-inflammatoires, citées plus haut, dans le sang, *in vivo*.

Etape 4) Caractérisation des métabolites présents dans le surnageant de *B. fragilis* et les fractions actives par analyses LC-MS/MS

Enfin, pour aller plus loin, une analyse des données spectrales par « Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry » (LC-MS/MS), a permis d'identifier deux métabolites, présents dans le surnageant et les fractions actives, qui pourraient être à l'origine de l'inhibition de la virulence de *S. Heidelberg*. Ce sont l'acide cholique (CA) et l'acide désoxycholique (DCA), ils ont été identifiés dans le surnageant de *B. fragilis* et les fractions actives. Cependant, seule CA a pu être dosé et incubé sur le modèle tri-cellulaire en présence de *S. Heidelberg*, pour ensuite tester ses effets sur la translocation de *S. Heidelberg*.

Etape 5) Impact de l'acide cholique (CA) sur la translocation de S. Heidelberg et le mécanisme d'action sur ses facteurs de virulence dans le modèle intestinal *in vitro*

Du CA synthétique a ensuite été incubé en présence de *S. Heidelberg* sur le modèle tricellulaire *in vitro*. Les résultats montrent une inhibition de la translocation de *S. Heidelberg* en présence de CA. Pour comprendre les mécanismes génétiques mis en jeu, l'expression des gènes de virulences de *S. Heidelberg* a été étudiée par analyses RT-qPCR (Real-Time quantitative PCR). L'inhibition du phénomène de translocation est associée à une diminution de l'expression des gènes *sipA* et *fliC*, sous exprimés en présence du surnageant de *B. fragilis*, des fractions actives. Le CA synthétique inhibe de manière significative l'expression de *sipA* mais pas l'expression de *fliC*. FliC est impliqué dans la mobilité intra et extracellulaire de *S. Heidelberg* et SipA dans l'invasion, par stabilisation de l'actine et de la vacuole dans les cellules intestinales. La diminution de l'expression de *fliC* et *sipA*, en présence des métabolites produits par *B. fragilis*, pourrait expliquer l'inhibition du phénomène de translocation de *S. Heidelberg*. CA pourrait être impliqué dans le mécanisme d'inhibition de la translocation en désactivant l'expression de *sipA*, mais d'autres métabolites non identifiés, car absents des bases de données spectrales, présents dans le surnageant et les fractions de *B. fragilis*, pourraient également jouer un rôle sur l'inhibition de *fliC*. Il serait nécessaire, à l'avenir, de poursuivre les études pour mieux caractériser les mécanismes d'inhibition des molécules produites par *B. fragilis*, contre la virulence de *S. Heidelberg*.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Mark Feitelson,
Temple University,
United States

REVIEWED BY

David Rios-Covian,
Institut National de recherche pour
l'agriculture, l'alimentation et
l'environnement (INRAE), France
Rosana Barreto Rocha Ferreira,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

*CORRESPONDENCE

Latifa Bousarghin
latifa.bousarghin@univ-rennes1.fr

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Microbial Symbioses,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

RECEIVED 19 August 2022

ACCEPTED 26 October 2022

PUBLISHED 10 November 2022

CITATION

Gautier T, Oliviero N, Ferron S, Le Pogam P,
David-Le Gall S, Sauvager A, Leroyer P,
Cannie I, Dion S, Sweidan A, Loréal O,
Tomasi S and Bousarghin L (2022)
Bacteroides fragilis derived metabolites,
identified by molecular networking,
decrease *Salmonella* virulence in mice
model.
Front. Microbiol. 13:1023315.
doi: 10.3389/fmicb.2022.1023315

COPYRIGHT

© 2022 Gautier, Oliviero, Ferron, Le Pogam, David-Le Gall, Sauvager, Leroyer, Cannie, Dion, Sweidan, Loréal, Tomasi and Bousarghin. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Bacteroides fragilis derived metabolites, identified by molecular networking, decrease *Salmonella* virulence in mice model

Thomas Gautier¹, Nolwenn Oliviero¹, Solenn Ferron², Pierre Le Pogam³, Sandrine David-Le Gall¹, Aurélie Sauvager², Patricia Leroyer¹, Isabelle Cannie¹, Sarah Dion⁴, Alaa Sweidan⁵, Olivier Loréal¹, Sophie Tomasi² and Latifa Bousarghin^{1*}

¹INSERM, Univ Rennes, INRAE, UMR 1241, Nutrition Metabolisms and Cancer Institute, Rennes, France, ²Univ Rennes, CNRS, ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes) - UMR 6226, Rennes, France, ³BioCIS, Université Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France, ⁴Univ Rennes, INSERM, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, Rennes, France, ⁵Laboratory of Microbiology, Department of Life and Earth Sciences, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath Campus, Beirut, Lebanon

In the gut microbiota, resident bacteria prevent pathogens infection by producing specific metabolites. Among bacteria belonging to phylum *Bacteroidota*, we have previously shown that *Bacteroides fragilis* or its cell-free supernatant inhibited *in vitro* *Salmonella* Heidelberg translocation. In the present study, we have analyzed this supernatant to identify bioactive molecules after extraction and subsequent fractionation using a semi-preparative reversed-phase Liquid Chromatography High-Resolution Tandem Mass Spectrometry (LC-HRMS/MS). The results indicated that only two fractions (F3 and F4) strongly inhibited *S. Heidelberg* translocation in a model mimicking the intestinal epithelium. The efficiency of the bioactive fractions was evaluated in BALB/c mice, and the results showed a decrease of *S. Heidelberg* in Peyer's patches and spleen, associated with a decrease in inflammatory cytokines and neutrophils infiltration. The reduction of the genus *Alistipes* in mice receiving the fractions could be related to the anti-inflammatory effects of bioactive fractions. Furthermore, these bioactive fractions did not alter the gut microbiota diversity in mice. To further characterize the compounds present in these bioactive fractions, Liquid Chromatography High-Resolution Tandem Mass Spectrometry (LC-HRMS/MS) data were analyzed through molecular networking, highlighting cholic acid (CA) and deoxycholic acid. *In vitro*, CA had inhibitory activity against the translocation of *S. Heidelberg* by significantly decreasing the expression of *Salmonella* virulence genes such as *sipA*. The bioactive fractions also significantly downregulated the flagellar gene *fliC*, suggesting the involvement of other active molecules. This study showed the interest to characterize better the metabolites produced by *B. fragilis* to make them means of fighting pathogenic bacteria by targeting their virulence factor without modifying the gut microbiota.

KEYWORDS

Bacteroides fragilis, supernatant, fractionation, microbiota, molecular networking, metabolites, cholic acid, virulence factors

Introduction

Among *Salmonella*, *Salmonella* Heidelberg (*S. Heidelberg*), causing severe extra-intestinal infections, displays a hypermutator phenotype related to the frequent occurrence of mutations in the genes involved in the methyl mismatch repair system (Wilmshurst and Sutcliffe, 1995; Le Gall et al., 2009; Le Gall-David et al., 2015). These bacteria have adapted to adverse and stringent environmental conditions, including the pressure of antibiotic exposure (Blázquez, 2003). New therapeutic alternatives, such as next-generation probiotics, are being developed to treat them. *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*), a part of commensal gastrointestinal flora, an obligate anaerobe, is proposed because of its well-known beneficial properties in food metabolism, in gut ecology and in anti-inflammatory effects (Wexler, 2007; Chu et al., 2016; Deng et al., 2016; Wang et al., 2017; Díaz-Garrido et al., 2021). It was also shown that *B. fragilis* and its cell-free supernatant inhibited the translocation of *S. Heidelberg*, in a complex multicellular model mimicking the intestinal epithelium (Vernay et al., 2020). *Salmonella* pathogenicity depends on a variety of virulence factors, including flagella (FliC) and three secretion systems (T3SSs). FliC enables *Salmonella* to penetrate the gastrointestinal mucus layer by triggering rapid and efficient contact with the cells lining the epithelium. T3SS system is a molecular syringe that can translocate the effector proteins such as SipA, SipC, SopA, SopB, and SopE2 directly from the bacteria into the cytosol of cells where they subvert cellular processes that contribute to bacterial invasion, actin rearrangement, membrane ruffling and other aspects of virulence (Hayward and Koronakis, 2002). SipA effector, actin-binding protein, directly modulate host actin dynamics to facilitate bacterial uptake (Zhang et al., 2018).

Our previous results suggested that *B. fragilis* produces bioactive molecules against *S. Heidelberg* virulence in its cell-free supernatant (Vernay et al., 2020). In addition, several probiotics and commensal bacteria, including *Lactobacillus* GG (LGG) and *Bifidobacterium breve*, have been shown to secrete metabolites exhibiting a beneficial effect against several intestinal disorders (traveler's diarrhea, antibiotic-associated diarrhea, and acute infectious diarrhea; Reid et al., 2003).

Numerous studies have shown that the gut microbiota contains healthy bacteria secreting metabolites that could help to fight diseases in the gut and other organs (Antunes et al., 2014; Postler and Ghosh, 2017; Sittipo et al., 2019). Accordingly, the intestinal microbiota generates metabolites that include folate, indoles, *gamma*-aminobutyric acid, serotonin, secondary bile acids (BAs), desaminotyrosine, and short-chain fatty acids (SCFAs). Several studies have suggested that these microbiota-derived metabolites, present in cell-free supernatants, may be an alternative to antibiotics in the struggle against pathogens such as *Escherichia coli* and *Salmonella* (Antunes et al., 2014; Li et al., 2018; Piqué et al., 2019; Hove et al., 2020). Peixoto et al. (2017) have shown that small molecules from human fecal microbiome such as aromatic compounds inhibited invasion of *Salmonella* SL1344 to HeLa cells (Peixoto et al., 2017).

In the present study, we have characterized the cell-free supernatant of *B. fragilis* by fractionating it and assessed its ability to inhibit *Salmonella* translocation. The effectiveness of the bioactive fractions was also investigated in a mouse model. A molecular networking analysis of the bioactive fractions was carried out to identify bioactive molecules.

Materials and methods

Bacteria and growth conditions

Bacteroides fragilis (*B. fragilis*) NTBF (Non Toxigenic *Bacteroides fragilis*), ATCC 25285 (Sears et al., 2014; Choi et al., 2016), was purchased from the American Type Culture Collection. *Bacteroides fragilis* growth conditions were described in a previous study (Vernay et al., 2020). The supernatant was filtered through a 0.22 μm -pore-size syringe filter as we described in Vernay et al., 2020.

Salmonella Heidelberg B182 strain (*S. Heidelberg*) was isolated on LB (Luria-Bertani) agar and grown in LB medium overnight at 37°C. *S. Heidelberg* was then subcultured by dilution in LB medium followed by incubation for 90 min at 37°C (Le Bars et al., 2012).

Bacteroides fragilis supernatant extraction

Bacteroides fragilis was cultured in 500 ml of complete DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) containing 20% of fetal bovine serum (FBS) and 1% of glutamine in an anaerobic chamber for 24 h. After this incubation, *B. fragilis* culture was centrifuged for 10 min at 11500 \times g. Cell-free supernatant was filtered, extracted with 2 \times 250 ml of ethyl acetate, and dried under vacuum.

Supernatant fractionation by semi-preparative HPLC

The supernatant extract was then fractionated by semi-preparative HPLC-DAD (Shimadzu, Marne La Vallée, France) using a reversed-phase Prevail™ C18-Select column (Grace; 250 \times 10 mm, 5 μm) and ultrapure water with 0.1% formic acid as solvent A and acetonitrile with 0.1% formic acid as solvent B. The following gradient system was applied at a flow rate of 2 ml/min in the HPLC system: initial: 100% (A); from 0 to 5 min: 100% (A); from 5 to 45 min: 100% (A) to 0% (A); from 45 to 50 min: 0% (A); from 50 to 55 min: 0% (A) to 100% (A); from 55 to 70 min: 100% (A).

The following fractions were collected and evaporated under vacuum: F1 (Fraction 1): rt. = 5–19 min, m = 14.6 mg; F2a: rt. = 19–26 min, m = 4.4 mg; F2b: rt. = 26–31 min, m = 2.7 mg; F3: rt. = 31–38 min, m = 4 mg; F4: rt. = 38–48 min, m = 4.3 mg; F5:

rt. = 48–60 min, m = 4.9 mg. Each fraction was then dissolved in MeOH at 1 mg/ml for further analysis.

Salmonella Heidelberg translocation inhibition assay *in vitro*

To evaluate the impact of the selected fractions on *S. Heidelberg* translocation, we used the same model composed of several cells, mimicking the intestinal epithelium, described in Vernay et al., 2020. Briefly, Caco-2/HT29-MTX were seeded on the apical chamber of polycarbonate Transwell® inserts. After 14 days of culture, Raji B cells were added to the basolateral chamber to induce differentiation of Caco-2 cells into M cells for 7 days.

To mimic *Salmonella* infection, *S. Heidelberg* was cultured as described in Vernay et al., 2020 and was added to the apical compartment at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria/cells at 37°C for 3 h. After incubation, basal and apical media were collected separately, and colony-forming units were counted. *S. Heidelberg* colonies were enumerated on GTS plates. Results were expressed as a ratio of the number of translocated bacteria collected in the basal compartment and the number of bacteria counted in the apical compartment.

To evaluate the impact of fractions on this *S. Heidelberg* translocation, each fraction (0.1 mg/ml) were added in the apical compartment along with *Salmonella* (MOI of 10). After 3 h of incubation, *S. Heidelberg* was enumerated as described above.

Bioactive fractions efficiency in inhibiting Salmonella Heidelberg translocation in mice model

BALB/c 8-week-old female mice ($n=5$ per group) were purchased from Janvier (France) and were housed in a specific animal facility with a controlled temperature-humidity. Upon delivery, mice underwent a one-week acclimation period. At the end of the adaptation, animals were randomly divided in the cages into four groups. The first group, control mice, received culture medium, complete DMEM, by gavage. The second group, *Salmonella*-infected mice, received 10^8 colony forming unit (CFU) of *S. Heidelberg* diluted in complete DMEM. The third group received 10^8 CFU of *S. Heidelberg* and bioactive fractions (mixture of F3 and F4 (1:1, v/v) corresponding to 0.1 mg/ml), and the last control group received only bioactive fractions (mixture of F3 and F4) diluted in complete DMEM. At 2, 4, and 7 days of treatments, DMEM was re-administered in the first and the second group, and bioactive fractions were re-administered in the last two groups. After 8 days of treatment, mice were euthanized before samples collection.

All experimental protocols were approved by the Adaptive Therapeutics Animal Care and Use Committee (APAFIS#31484–2,021,050,308,355,787 v6). Experiments were monitored in the

ARCHE-BIOSIT animal lab at Rennes University and were carried out under level 2 high-risk biosecurity procedures.

Salmonella Heidelberg dissemination in spleen, Peyer's patches, and liver

Bacterial loads in feces, colon, spleen, Payer's patches and liver were removed by vortexing with 3 mm glass beads and gravity sedimentation for 10 min. They were then serially diluted in water and spread on LB rapid' *Salmonella* chromogenic agar (Biorad, France) to identify only *Salmonella* colonies; the results represented only these enumerated colonies.

RNA extraction, cDNA synthesis, RT-qPCR

For *in vitro* samples, after incubating the multicellular model with *S. Heidelberg* for 3 h, 350 µl of lysis buffer was added until 20 min at ambient temperature to recover cells' RNA. Then, 50 µl of lysozyme solution (20 mg/ml) was added for 30 min to recover the bacterial RNA.

For the *in vivo* assay, the mice colon was collected and frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C for later.

RNAs were extracted using an RNA purification kit, including DNase digestion on-column (MACHEREY-NAGEL), following manufacturer instructions. RNAs were transcribed into cDNA with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and, following the protocol provided by the manufacturer. The no reverse transcriptase controls were also set up along with sample reactions so as to confirm the absence of genomic DNA contamination. Then, the selected genes were relatively quantified using StepOnePlus (Applied Biosystems) with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Le Bars et al., 2012). All primers used in this study are described in Table 1. Data analysis was carried out with QuantStudio™ Real-Time PCR Software. Ct values for each gene were normalized to housekeeping gene Ct values: *16S* RNA for *S. Heidelberg* and *hprt1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) for mice.

Plasma cytokine measurement

Blood samples were obtained at the time of sacrifice *via* cardiac puncture, and they were collected in heparin tubes. After centrifugation, the plasma was diluted, and cytokines were quantified. To investigate these murine cytokines, bead-based immunoassays were used, according to the manufacturer's protocol, with a filter plate and a vacuum filtration system for washing steps (LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel kit, BioLegend). Samples were analyzed on an LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson, Plateform CytomrTRI, SFR Biosit-UMS CNRS 3480-INSERM 018, Rennes). The concentrations of these

TABLE 1 Primers used in this study.

Genes	Forward	Reverse
<i>16S RNA</i>	AGGCCTTCGGGTGTAAAGT	GACTCAAGCCTGCCAGTTTC
<i>sipA</i>	AAGATTTCCCGTGATC	GCTTCTTAGCGACATT
<i>fliC</i>	TCTTCCGGTCTGCGTATCAA	CCTTTGATGTTCCGGTGAA
<i>cldn-1</i>	AAGGTGCTGCTGAGGGTAGA	GGTGTGGGTAAGAGGTT GT
<i>cldn-2</i>	AAGGTGCTGCTGAGGGTAGA	AGTGGCAGAGATGGGATTTG
<i>occludin</i>	AGGCTTCTGGATCTATGTACG	ATGAACCCAGGACAATG
<i>muc-2</i>	TGTGGAACCGGAAGATG	GACCACAGGTATGGTTCTGGA
<i>hpr1</i>	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC

cytokines in plasma were calculated based on their corresponding standard curves.

Histology and neutrophils infiltration score

Tissue samples from the colon were collected and stored in 4% paraformaldehyde solution for 24 h and then included in kerosene wax with Excelsior ES 50 for H&E staining. Kerosene block sections were cut to a 4 µm thickness and mounted on glass slides where longitudinal histological sections were observed. Tissue sections were stained with Hematoxylin / Eosin / Saffron with Leica ASP 300. Colon images were obtained using digital slide scanner Nanozoomer 2.0RS and analyzed with the NDP.view2 viewing software. The morphology of the colon sections was observed to detect neutrophils infiltration and the percentage of neutrophils infiltration was calculated by considering the surface area of the infiltrate zone compared to the whole colon section. The infiltration rate is calculated taking into account the surface of the infiltrate on the total surface.

Fecal microbiota analysis using 16S rDNA

Fecal samples were collected on day 8 and were immediately stored at −80°C for DNA extraction using the Qiagen Powerfecal Pro DNA kit. V3-V4 region of the 16S rDNA was amplified using forward primers containing the sequence (CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTACGGRAGGAGCAG) and R784 reverse primers (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT). To reveal 510 bp amplicons by electrophoresis, PCR was conducted using 30 amplification cycles and an annealing temperature of 62°C. Single multiplexing was performed using a 6-bp internal index, which was added to R784 in a second 12-cycle PCR using the forward primer (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACGAC) and reverse primer (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT). Purified PCR products were placed into the Illumina MiSeq automated system. The Illumina V3 kit enables 300 bp paired-end reads. Thus, reads from two ends limited by the two

primers could be assembled, generating high-quality reads from all targeted regions. Each pair-end sequence was assembled using Flash v1.2.6 software. Qiime 2 pipeline was used to process raw sequences (v. 2018.4).¹ Files were imported in “PairedEnd FastqManifestPhred33” format; Dada 2 was performed to denoising reads (Callahan et al., 2016). Reverse and Forward sequences were truncated to 240 bases, and all other parameters were set to default. Detection of the chimeric sequence was provided by VSEARCH (Rognes et al., 2016). Silva (version 138) reference database (Quast et al., 2012) was used to identify non-16S rDNA genes, and for open reference clustering, with a similarity threshold of 99%, of amplicon sequence variants (ASVs). ASVs present in a single sample or those with total frequency of less than 10 were removed. Reads that were unassigned or assigned to Archaea were removed from the final table. QIIME2 diversity-metrics-phylogenetic plugin was performed to Core diversity analysis, with a specific sampling depth of 10,950 reads.

LC–MS/MS analysis

Complete DMEM, supernatant and all fractions (F1, F2a, F2b, F3, F4, and F5) were analyzed using an Agilent 6,530 Accurate-Mass Q-TOF hyphenated with a 1,260 Agilent Infinity LC system fitted with a Sunfire Analytical C18 column (150 × 2.1 mm, i. d. 3.5 µm, Waters). The MS system was operating in either positive or negative polarity. HPLC analyses were performed by gradient elution based on the following program: A (0.1% formic acid in Milli-Q water) and B (acetonitrile); T, 0–2 min, 0% B; 2–30 min, 100% B linear; 30–40 min, 100% B; 40–50 min, 0% B with a flow rate of 0.25 ml/min. ESI (electrospray ionization) conditions were set as follows: capillary temperature at 320°C, source voltage at 3500 V in positive-ion mode and 2,500 V in negative-ion mode, and a sheath gas flow rate at 10 l/min. Fragmentor and skimmer voltages were set at 175 and 65 V, respectively. The injected volume was 8 µl. Mass spectrometric analyses were divided into six scan events using a data-dependent scanning method: at first, positive or negative MS (mass range: *m/z* 100 to 1,200), and

¹ <https://qiime2.org/>

data-dependent MS/MS scans of the five most intense ions, from the first scan event at three collision energies (*viz.* 30, 50, and 70 eV, in positive-ion mode and 10, 25 and 40 eV in negative polarity). Only singly charged species could be selected for subsequent fragmentation with an isolation of m/z 1.3 a.m.u. To perform the real-time lock mass correction, a solution including trifluoroacetic acid ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, m/z 112.98559 in negative-ion mode), purine ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4$ at m/z 121.050873 in positive polarity) and hexakis (1*H*, 1*H*, 3*H*-tetrafluoropentoxy)-phosphorene ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{F}_{24}$ at m/z 922.009798 (positive), 1033.988109 (negative, trifluoroacetate adduct)) were continuously infused. A permanent MS/MS exclusion list comprising these different reference masses was defined to preclude their selection as precursors for fragmentation.

Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) and cytoscape analysis

The MS² data files related to the supernatant and different fractions thereof were converted from the .d (Agilent) standard data format to .mzXML format using the MSConvert software, part of the ProteoWizard package (Chambers et al., 2012). A molecular network was created using the online Molecular Networking workflow (version release_8) at GNPS (Wang et al., 2016)² with a parent mass tolerance of 0.02 Da and an MS/MS fragment ion tolerance of 0.02 Da. A network was then created where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and more than 6 matched peaks. Further edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other's respective top 10 most similar nodes. The spectra in the network were also searched against GNPS spectral libraries. All matches kept between network spectra, and library spectra were required to have a score above 0.7 and at least 3 matched peaks. The molecular networking data were analyzed and visualized using Cytoscape (ver. 3.8.0; Shannon et al., 2003). The different ions were tagged according to their occurrence within the different analyzed samples. Culture medium without bacteria (complete DMEM), supernatant, and each fraction were compared.

Cholic acid (CA) quantification in bioactive fractions

CA present in the fractions was detected using an analytical HPLC system Diode Array Detector (LC-DAD; Shimadzu, Marne La Vallée, France) associated to an evaporative light scattering detector (ELSD) and quantified by comparison to known amounts of standard CA purchased from Merck. A reversed Hypersil GOLD aQ column (5 μm , 250 \times 4.6 mm, ThermoFisher Scientific) was used and a

gradient system was applied: A (0.1% formic acid in water) and B (0.1% formic acid in acetonitrile). The following gradient was applied at a flow rate of 0.8 ml/min in the HPLC system: initial: 100% (A); from 0 to 5 min: 100% (A); from 5 to 35 min: 100% (A)/0% (B) to 0% (A)/100% (B); from 35 to 45 min: 100% B; from 45 to 50 min: 100% (A)/0% (B) to 0% (A)/100% (B); from 50 to 55 min: 100% (A). Forty microliters of samples at 1 mg/ml in acetone were injected. A series of standard solutions of synthetic CA with the concentration range 0.005–0.25 mg/ml were prepared. The correlation coefficient of the calibration curve was 0.9976.

Salmonella Heidelberg translocation inhibition assay in the presence of CA

To evaluate the impact of CA on *S. Heidelberg* translocation, synthetic CA (156 $\mu\text{mol/l}$) diluted in complete DMEM, was added in the apical compartment at the same time as *Salmonella* (MOI of 10). *Salmonella* alone or CA alone were used as controls. After 3 h of incubation, *S. Heidelberg* in the apical and basal compartment was enumerated as described above to determine the rate of translocation.

Statistics analysis

All experiments were performed in triplicates at least or more for *in vitro* tests. Normality of data distribution was confirmed using the Shapiro–Wilk test, differences within and between groups were calculated using a two-way analysis of variance (ANOVA one way); otherwise, the non-parametric Kruskal–Wallis test was used. PERMANOVA test was used for Beta diversity analysis. Data presented as mean \pm SEM, and a value of *p* less than 0.05 was considered significant. The analysis of data and generation of the graph were performed by Graph Pad Prism software (Version 8.0).

Results

Two fractions (F3 and F4) of *Bacteroides fragilis* supernatant inhibited *S. Heidelberg* translocation *in vitro*

To facilitate the identification of compounds from the cell-free supernatant of *B. fragilis* (SN) involved in *Salmonella* translocation inhibition, a fractionation was performed by a semi-preparative reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD). Six fractions (F1, F2a, F2b, F3, F4, and F5) were collected based on the range of retention time (RT in min) and the peak patterns. The ability of the SN and each fraction to inhibit *S. Heidelberg* translocation was evaluated by incubating them on a multicellular model (enterocytes, mucus, and M cells) in the presence of *S. Heidelberg*. After 3 h of incubation with

² <http://gnps.ucsd.edu>

S. Heidelberg, the results showed that the F3 and F4 fractions, as well as SN, induced a significant decrease in *S. Heidelberg* translocation (Figure 1B), whereas F5 did not significantly decrease this translocation as for the other fractions (F1, F2a and F2b; data not shown). In addition, these fractions (F1, F2a, F2b, F3, F4, and F5) did not impact *Salmonella* growth (Figure 1A).

To better characterize the mechanism of action of these two fractions, the expression of *Salmonella* virulence genes, *sipA*, and *fliC* was evaluated. The results showed that SN, F3 and F4 significantly decreased *sipA* expression (0.65 ± 0.2 , 0.46 ± 0.2 and 0.69 ± 0.2 folds, respectively; Figures 1C,D). Expression of *fliC* was also significantly decreased in the presence of F3 but not with F4 and SN (0.5 ± 0.2 and 0.75 ± 0.2 , respectively). F5 did not decrease *sipA* and *fliC* expression (1.06 ± 0.2 and 1.07 ± 0.2 , respectively). These results suggested that translocation inhibition in the presence of SN, F3 and F4 could be induced by the decrease of *sipA* and/or *fliC*.

The mixture of F3 and F4 inhibited salmonella translocation in BALB/c mice

To determine if the antagonistic activity of bioactive fractions *in vitro* against *S. Heidelberg* could also occur *in vivo*, *S. Heidelberg* was administered orally to mice. For this purpose, the bioactive fractions F3 and F4 were mixed (1:1, v/v) to test their combined effects *in vivo*. After 8 days of *S. Heidelberg* infection, mice were sacrificed, and samples were collected. Feces, colon, liver, Peyer's patches and spleen were crushed, and numeration of *S. Heidelberg* colonies was performed in each organ. The results showed that there was no significant difference in enumeration in feces, colon, and liver between mice infected with *S. Heidelberg* alone or those having received both *S. Heidelberg* and bioactive fractions of *B. fragilis* (Figures 2A–C). However, when fractions were administered with *S. Heidelberg*, a significant two-fold decrease was noted for the number of *S. Heidelberg* in Peyer's (Figure 2D). In the presence of bioactive fractions, *S. Heidelberg* was also significantly decreased in the spleen compared to mice receiving *S. Heidelberg* alone (Figure 2E). These results suggest that molecules present in the fractions inhibited translocation into Peyer's patches and then into the spleen.

Bioactive fractions decreased inflammation during Salmonella Heidelberg infection in mice

Hematoxylin/Eosin (H&E) histology showed that the neutrophils infiltration score was very low (basal level 1%) in mice without bacteria (Figure 3A) or with bioactive fractions (Figure 3B), and no difference was found between the two groups (Figure 3E). In mice receiving only *S. Heidelberg*, infiltration of inflammatory cells can be observed as indicated by the red arrows (Figure 3C), and the score is 15% (Figure 3E). When bioactive

fractions were co-administered with *S. Heidelberg*, less neutrophil infiltration was detected (Figure 3D) and the score significantly decreased to 1% as the controls (Figure 3E). Our data suggest that *S. Heidelberg* activated strong recruitment of inflammatory cells restored by the treatment with the bioactive fractions (Figure 3E).

Because the fractions decreased infiltration of inflammatory cells, we further evaluated cytokine levels in these mice. We selected and examined the levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the mice plasma. The results showed a significant increase in the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IFN- γ , and IL12p70 in the group infected with *S. Heidelberg* (Figures 4A,B,E,F). IL-17 α , MCP-1, and Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), mediators implicated in the recruitment and differentiation of a variety of immune/inflammatory cells, were also increased, which correlated with neutrophils infiltration in the colon of these mice (Figures 4C,G,H).

The addition of bioactive fractions significantly reduced circulating levels of chemoattractant and inflammatory cytokines, which are elevated in *S. Heidelberg* infection. These results and those obtained with H&E staining suggested that a key aspect of bioactive fractions action might include modulation of inflammatory cells mobilization. IL-10 is decreased by 3-fold in mice receiving *Salmonella* and bioactive fractions; however, the difference was not significant (Figure 4I).

Bioactive fractions improved tight junction genes expression in mice colon

Tight junction genes [claudin (*cldn-1*, *cldn-2*) and *occludin*] expression was downregulated after *S. Heidelberg* infection with a significant difference for *cldn-1* (Figures 5A–C). However, bioactive fractions co-administration with *S. Heidelberg* significantly reversed the expression of *cldn-1* (Figure 5A) and *occludin* (Figure 5C). *Cldn-1* was also upregulated in mice receiving only fractions without *Salmonella*, contrary to *cldn-2*, and *occludin*. When the impact of fractions on the mucus layer was evaluated by detecting *mucin-2* gene (*muc-2*), no significant difference was detected in *muc-2* expression (Figure 5D). The bioactive fractions are beneficial to maintaining barrier function through upregulating the relative RNA abundance of *occludin* and *cldn-1*.

Bioactive fractions decreased the genus Alistipes without altering gut microbiota diversities

The alpha diversity showed no significant difference between the four mice groups (Figures 6A,B). However, the beta diversity was significantly different (value of $p = 0.003$) between mice receiving *S. Heidelberg* and mice without *S. Heidelberg*, suggesting a change in diversity caused by *S. Heidelberg* infection (Figure 6C). Bioactive fractions

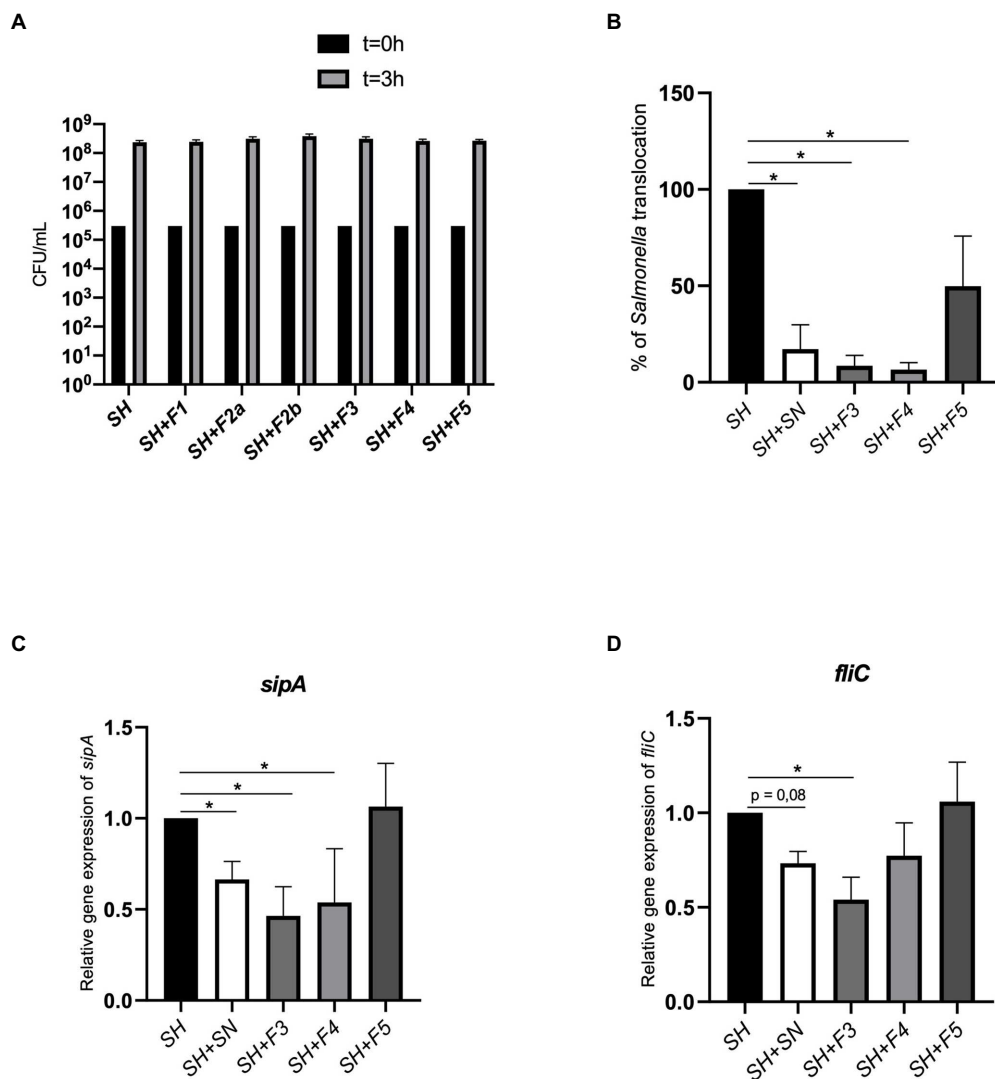


FIGURE 1

F3 and F4 fractions inhibited *Salmonella* translocation *in vitro*. (A) Effect of fractions (F1, F2a, F2b, F3, F4, and F5) on *Salmonella* Heidelberg (SH) growth [colony forming unit (CFU)/ml] after 3h of infection. (B) Impact of *Bacteroides fragilis* F3, F4, or F5 fractions and supernatant (SN) on *Salmonella* Heidelberg translocation across an *in vitro* multicellular model mimicking the intestinal epithelium. Results were expressed as % of translocation normalized to *Salmonella* alone (SH). (C) Impact of SN, F3, F4, and F5 on *SipA* expression, (D) Impact of SN, F3, F4, and F5 on *fliC* expression. Results were normalized to the cells treated only with *Salmonella*. The Shapiro and the Kruskal-Wallis tests were performed on $n=5$ for this experiment. The Shapiro test was used to verify normality; the one-way ANOVA test was performed on $n=5$. All data are presented as means (SEM); * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

administration alone or with *S. Heidelberg* did not impact the beta diversity of mice gut microbiota. At the phylum level, the compositional analytic results showed that *Bacillota*, *Bacteroidota*, and *Desulfobacterota* were the most dominant bacteria in all groups, with no significant variation was detected between groups (Figure 6D). Nevertheless, the abundance of the phylum *Bacteroidota* was not significantly declined in the group receiving the fractions alone compared to the other groups. However, at the genus level, *Alistipes* were significantly decreased in the group receiving the bioactive fractions alone, whereas in the presence of *S. Heidelberg*, no significant decrease was induced (Figure 6E). On the other

hand, when we analyzed the genus *Roseburia*, described as decreasing inflammation (Tamanai-Shacoori et al., 2017; Nie et al., 2021), the difference was not significant (Figure 6E).

Identification of potential bioactive compounds in fractions: cholic acid and deoxycholic acid

To identify candidate bioactive molecules present in the fractions inhibiting *S. Heidelberg* translocation, HPLC-HRMS² profiles were acquired (in both positive and negative polarities).

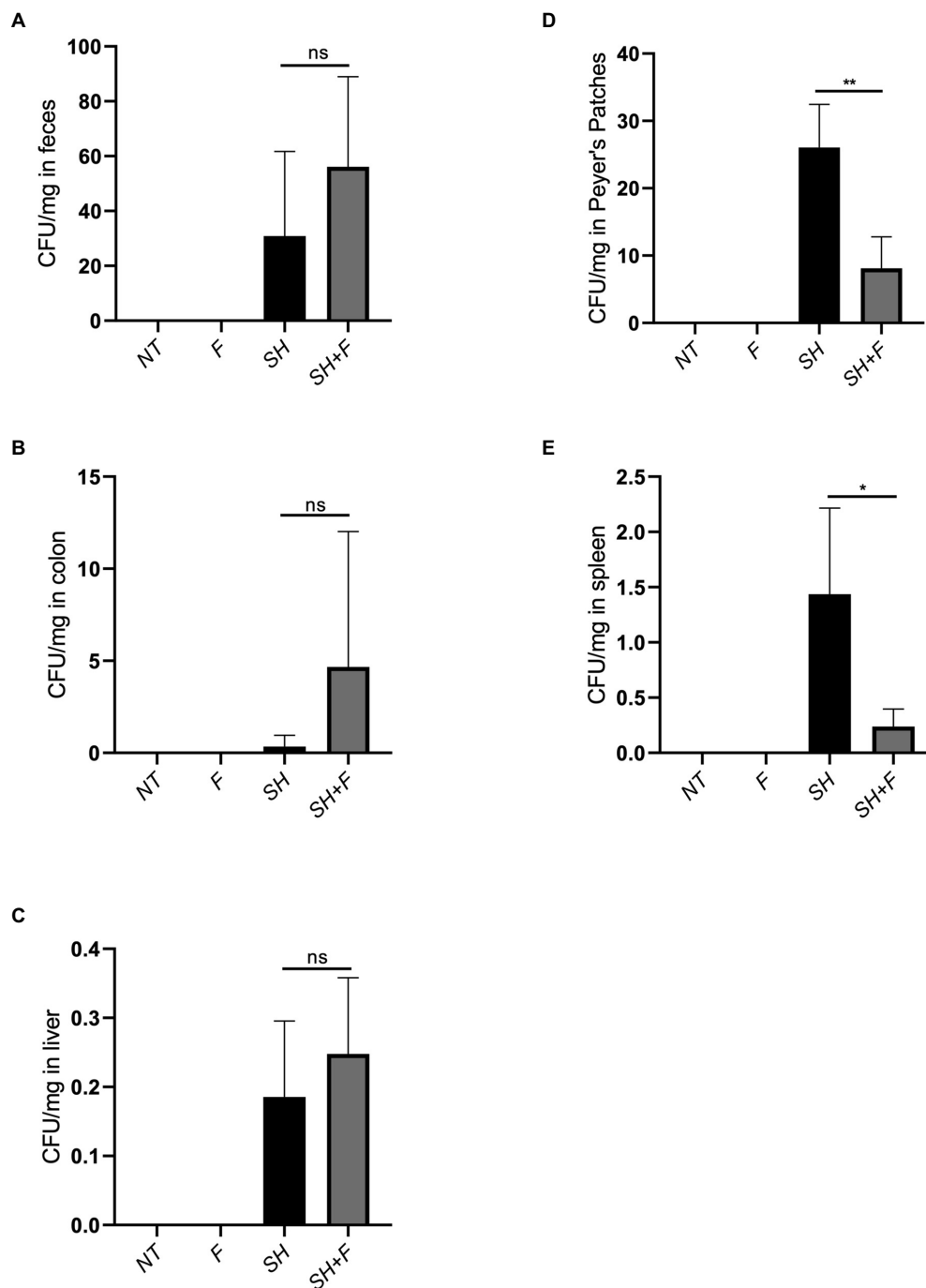


FIGURE 2

The mixture of F3 and F4 decreased translocation of *S. Heidelberg* in BALB/C mice. Effects of bioactive fractions on bacterial load during *Salmonella* infection. Several groups were used in the study, untreated mice (NT), mice receiving only *Salmonella* (SH), mice receiving only fractions (F) and mice receiving both *Salmonella* and fractions (SH+F). After 8 days of infection, *Salmonella* was extracted from (A) feces, (B) colon, (C) liver, (D) Peyer's patches, and (E) spleen, and plated on rapid *Salmonella* chromogenic agar. CFU/mg represented the number of CFU of bacteria recovered per milligram of tissue. The Shapiro test was used to verify Normality. Statistical data were evaluated by the one-way ANOVA test on $n=5$. Data were represented by SEM bars, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and ns=no significant.

These data were subsequently processed using the classical molecular-networking workflow (Wang et al., 2016; Figure 7A). Only ions specific to the supernatant (SN) and bioactive fractions were investigated; other contents of the culture medium

(complete DMEM) and the other fractions (F1, F2a, F2b, and F5) were not selected for further processing. The cursory examination of the molecular network revealed 24 ions specific to the bioactive fractions F3 and F4. Among them, we focused on two metabolites

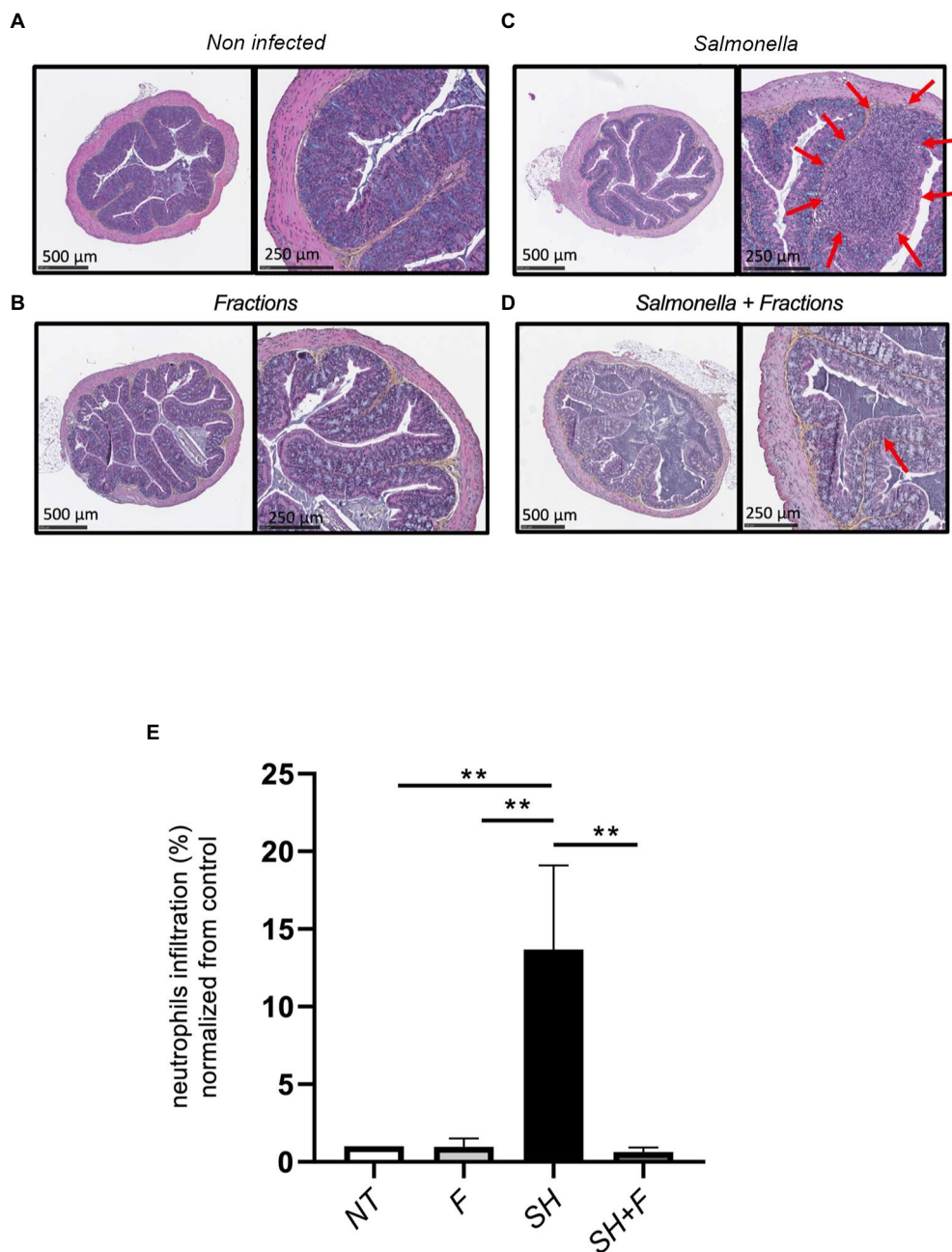
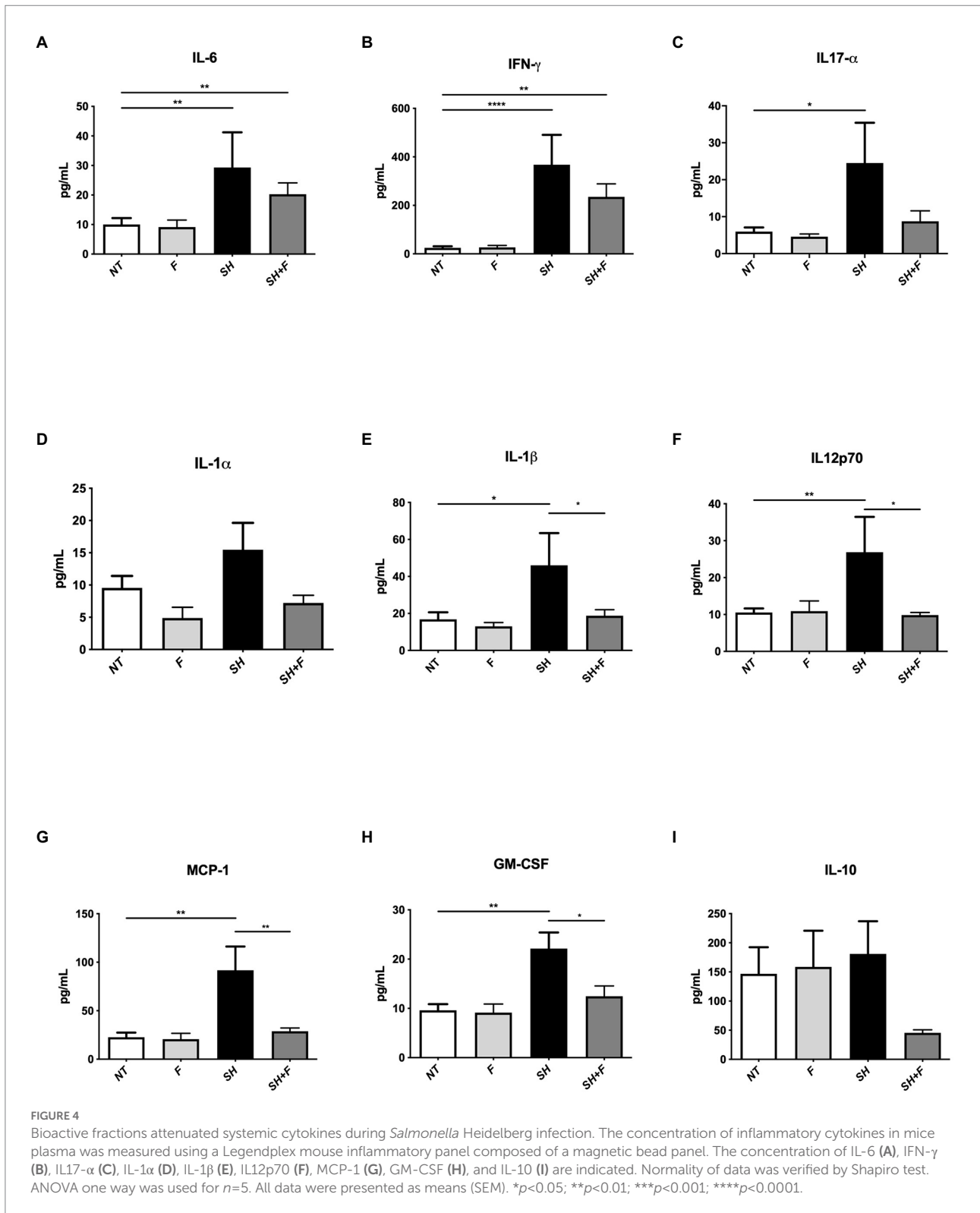


FIGURE 3

Bioactive fractions inhibited neutrophils infiltration in mice colon. (A) Histologic analysis of the colon of untreated mice (NT), (B) mice treated by bioactive fractions alone (F), (C) mice infected by *Salmonella* Heidelberg alone (SH), and (D) mice receiving *Salmonella* and bioactive fractions (SH+F). H&E stained cross-section of the colon of mice of each group showed the presence of neutrophils infiltration (red arrows) in *Salmonella* group only, which was decreased when the bioactive fractions were administered. (E) Quantification of neutrophils was represented by % of neutrophils infiltration normalized from the control. Scale bar: 500 and 250 μ m. ANOVA one-way statistical analysis test was used for $n=5$, normality of data was evaluated by Shapiro test. Data were represented by SEM bars ** $p<0.01$.

identified by the GNPS database, including CA and DCA (Figure 7B), described as potential inhibitors of pathogenic bacteria (Schmidt et al., 2001). The prominent node of CA (m/z 407.288) indicated that CA is a major compound in the supernatant and the two associated bioactive fractions (F3 and F4). DCA was only present in the supernatant and the fraction

F4. The unidentified ions could correspond to either new molecules or to compounds that have not yet been uploaded to the GNPS repositories. Two potential candidate ions (m/z 329.24 and m/z 215.134), not recognized by comparison against the GNPS spectral libraries, were also found in the supernatant, in F3, and F4 (green circle). Figure 7B also showed that F3 contained



11 unidentified molecules (orange circle) whereas F4 contained 10 specific metabolites (pink circle).

Then, HPLC coupled with an ELSD detector or mass spectrometric detection was used to quantify CA and DCA in the supernatant and fractions. Calibration curves of the synthetic

reference compounds CA and DCA were used to estimate their concentrations. CA was detected at 156 $\mu\text{mol/l}$ in the supernatant, at 36.7 and 19.6 $\mu\text{mol/l}$ in F3 and F4, respectively, whereas DCA was not detected, probably due to it occurring below the detection limit (Table 2).

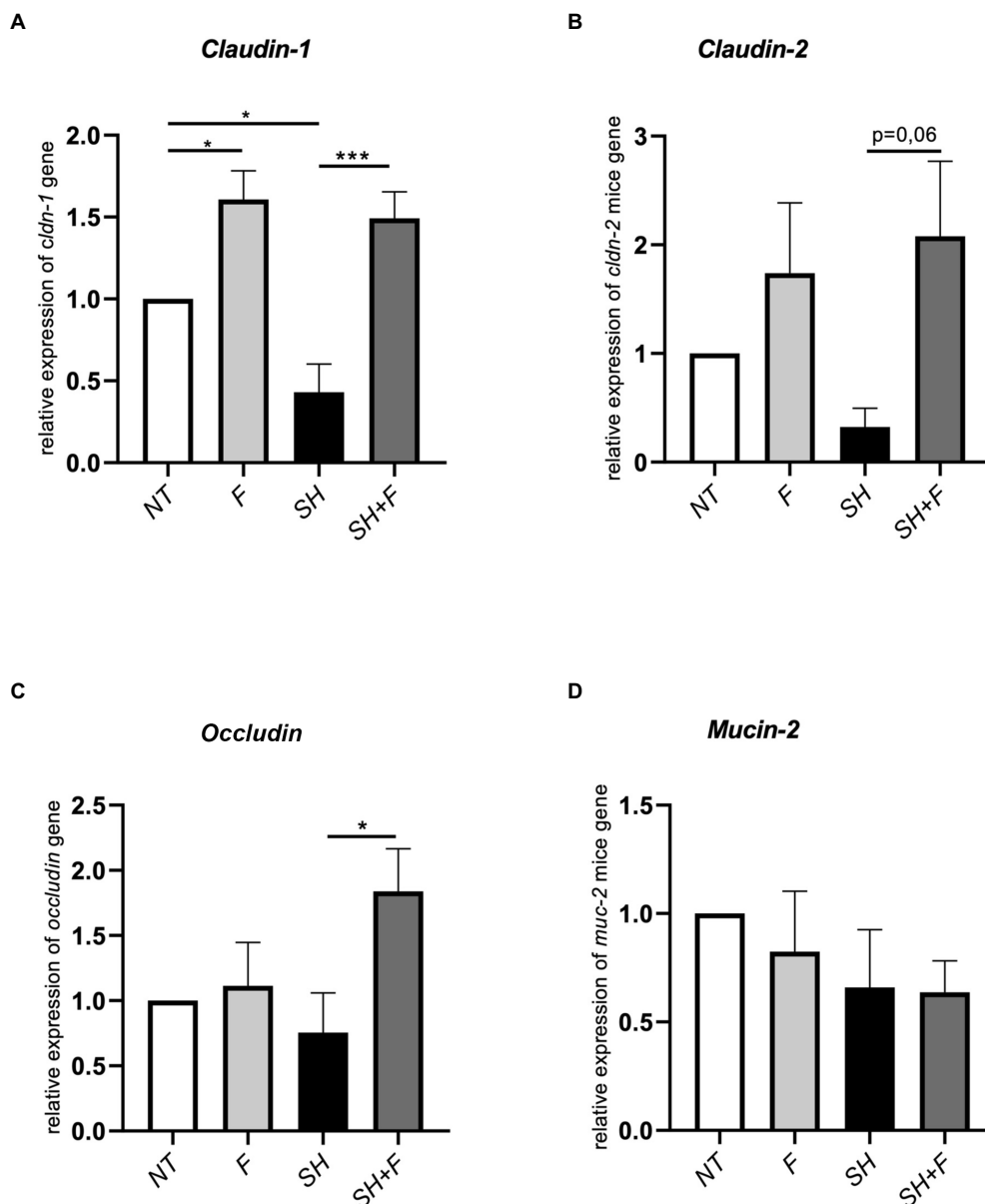


FIGURE 5

Bioactive fractions improved tight junction genes expression in mice colon. Relative expression of (A) claudin-1 (*cldn-1*), (B) claudin-2 (*cldn-2*), (C) occludin, and (D) mucin-2 (*muc-2*) in colon tissue from mice treated with bioactive fractions (F), mice infected with *S. Heidelberg* (SH) and mice receiving both *S. Heidelberg* and bioactive fractions (SH+F). Results are normalized to control mice without fraction and without *Salmonella* (NT). All genes were reported based on the reference housekeeping gene *hprt* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*). Normality of data was verified by Shapiro test and ANOVA one way was used. All data were presented as means (SEM), $n=4-5$. * $p<0.05$ and *** $p<0.001$.

This high level of CA in the supernatant confirmed the results obtained in the molecular network, leading us to investigate the role of CA in *S. Heidelberg* translocation inhibition. We have incubated *S. Heidelberg* with 156 $\mu\text{mol/L}$ of synthetic CA on the tri-cellular model, under the same conditions as described above. The data showed that CA significantly inhibited the translocation of *S. Heidelberg*, and decreased the expression of *sipA* as F3 and F4 fractions (Figures 8A,B). However, for *fliC* expression in the presence of CA, the difference was not significant ($p=0.10$). F3 downregulated both *sipA* and *fliC*, seeming more efficient than CA and F4. In

addition, F3 showed 11 unidentified ions (Figure 7B in orange), suggesting that one (or more) of these metabolites could play a crucial role in *S. Heidelberg* virulence expression. It will be indispensable to identify them to characterize their molecular mechanisms.

Discussion

Gut microbiota contains healthy bacteria producing molecules that could help to fight diseases in the gut and other organs

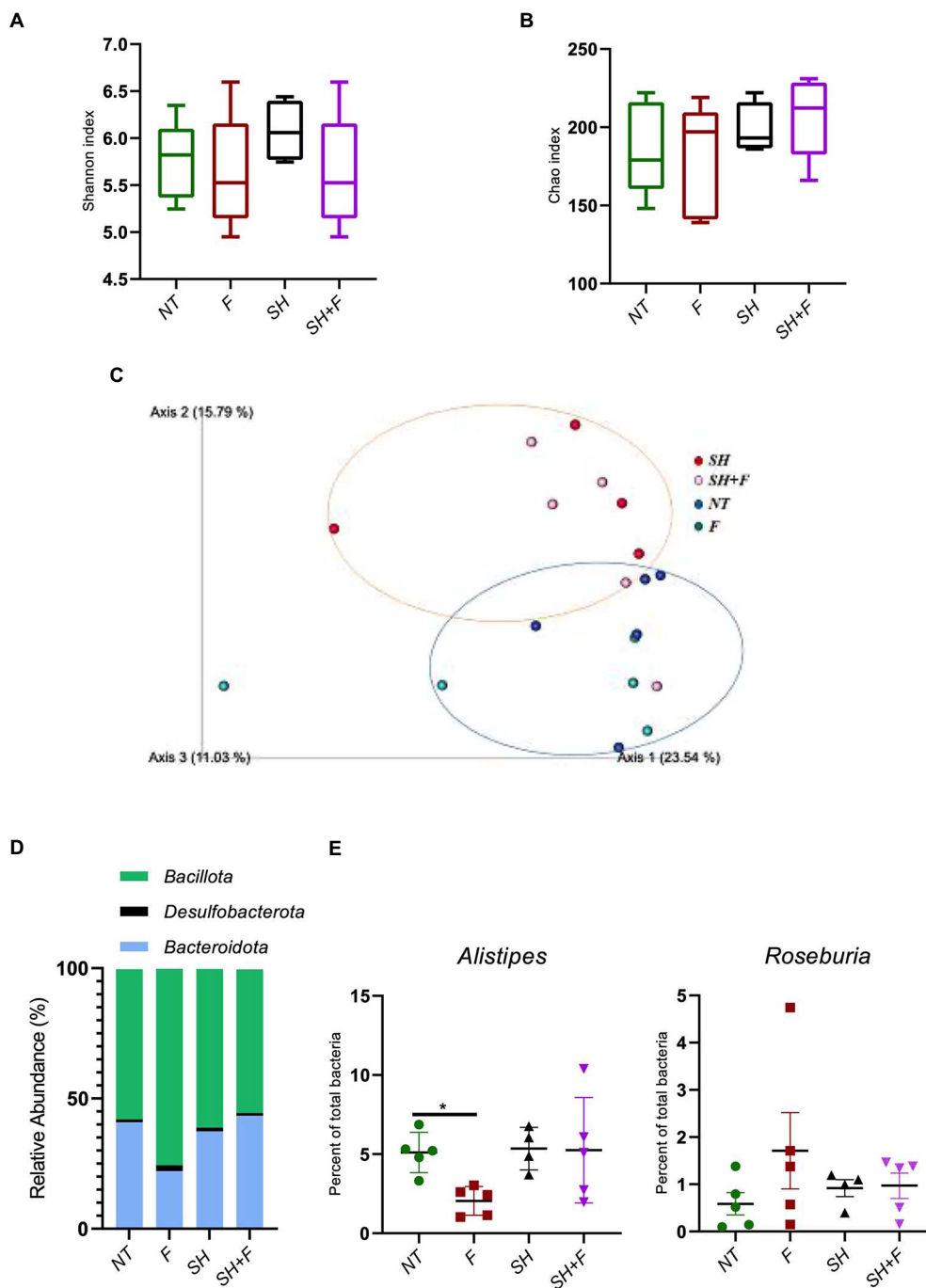


FIGURE 6
Bioactive fractions decreased the genus *Alistipes* without modifying gut microbiota diversities. Studies on the mice microbiota (16S analysis) were performed on fecal samples. Alpha and Beta diversity studies were completed using a script compatible with the Qiime 2 visualization software. Alpha diversity was represented by the Shannon index (A) and the Chao index (B). (C) Inter-individual Beta diversity was represented by Qiime 2 visualization based on beta diversity distance (Bray–Curtis dissimilarity). The blue circle represented the Beta diversity cluster of the mice groups not infected with *S. Heidelberg*. The orange circle represented the Beta diversity cluster of the groups of mice infected with *S. Heidelberg*. (D) Relative abundance of bacteria phyla was represented excepted phyla with a relative abundance of <0.5%. (E) Quantification of *Alistipes* and *Roseburia* genera in each mice group.

(Antunes et al., 2014; Postler and Ghosh, 2017; Sittipo et al., 2019). SCFAs, particularly butyrate and propionate, reduced inflammatory bowel diseases (IBD) and decreased inflammation

in patients (Silva et al., 2018; Li et al., 2021). These compounds were shown to increase the expression of cell junction genes and to decrease that of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8,

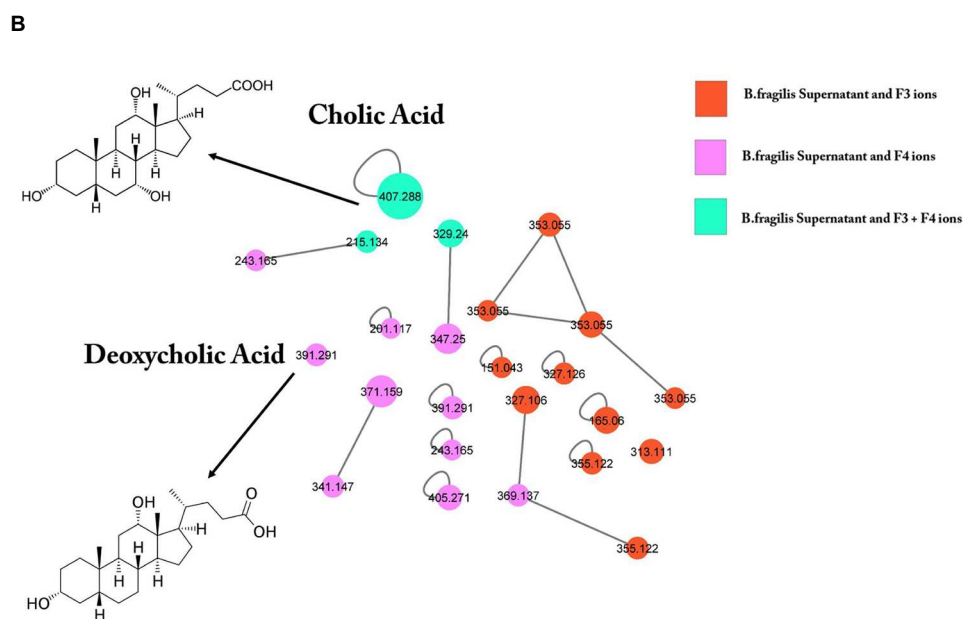
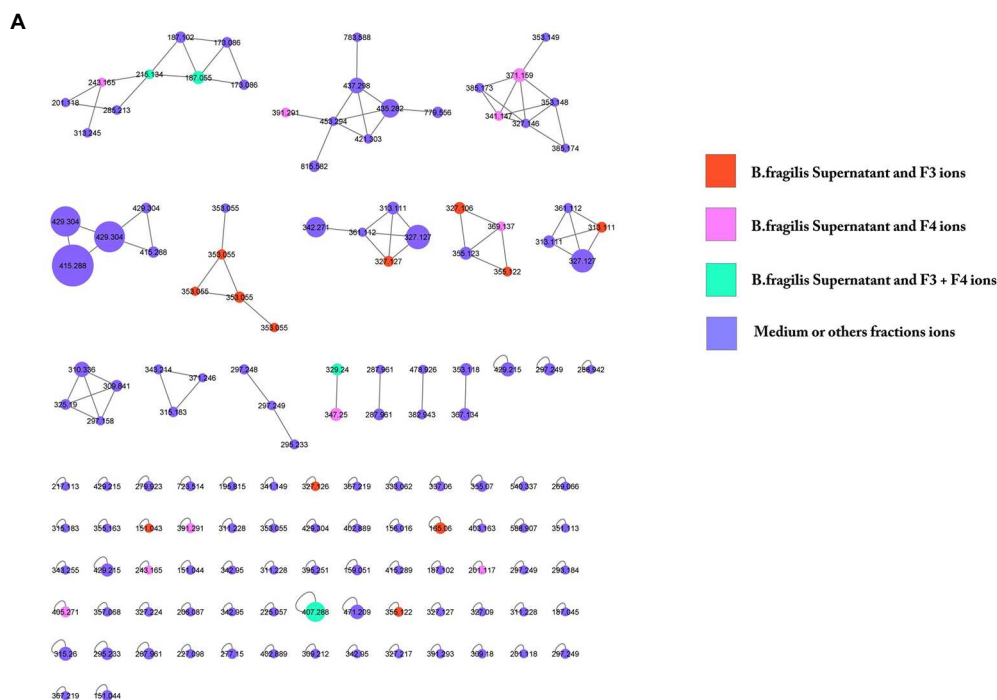


FIGURE 7
 GNPS molecular networking of negative ion MS/MS spectral data showing a selection of ions in bioactive fractions (F3 and F4). **(A)** Data were recorded in negative ionization mode. The nodes display the measured average masses of the molecular ions with identical MS/MS spectra. The numbers on the nodes represent the parent mass of the molecules. Node size reflects the bioactivity scores of the ions; node color indicates the abundance in the different conditions. The nodes in orange correspond to compounds present both in *B. fragilis* supernatant and in F3; nodes in pink correspond to compounds present both in supernatant and F4; nodes in green correspond to compounds present in all (supernatant, F3 and F4); nodes in purple correspond to ions solely found in DMEM. GNPS analysis of *B. fragilis* supernatant and bioactive fractions after LC-MS/MS showed the presence of 24 specific molecules of these fractions, 11 molecules for F3, 10 molecules for F4, and 3 molecules for both. **(B)** Among them, cholic acid (CA) and deoxycholic acid were identified.

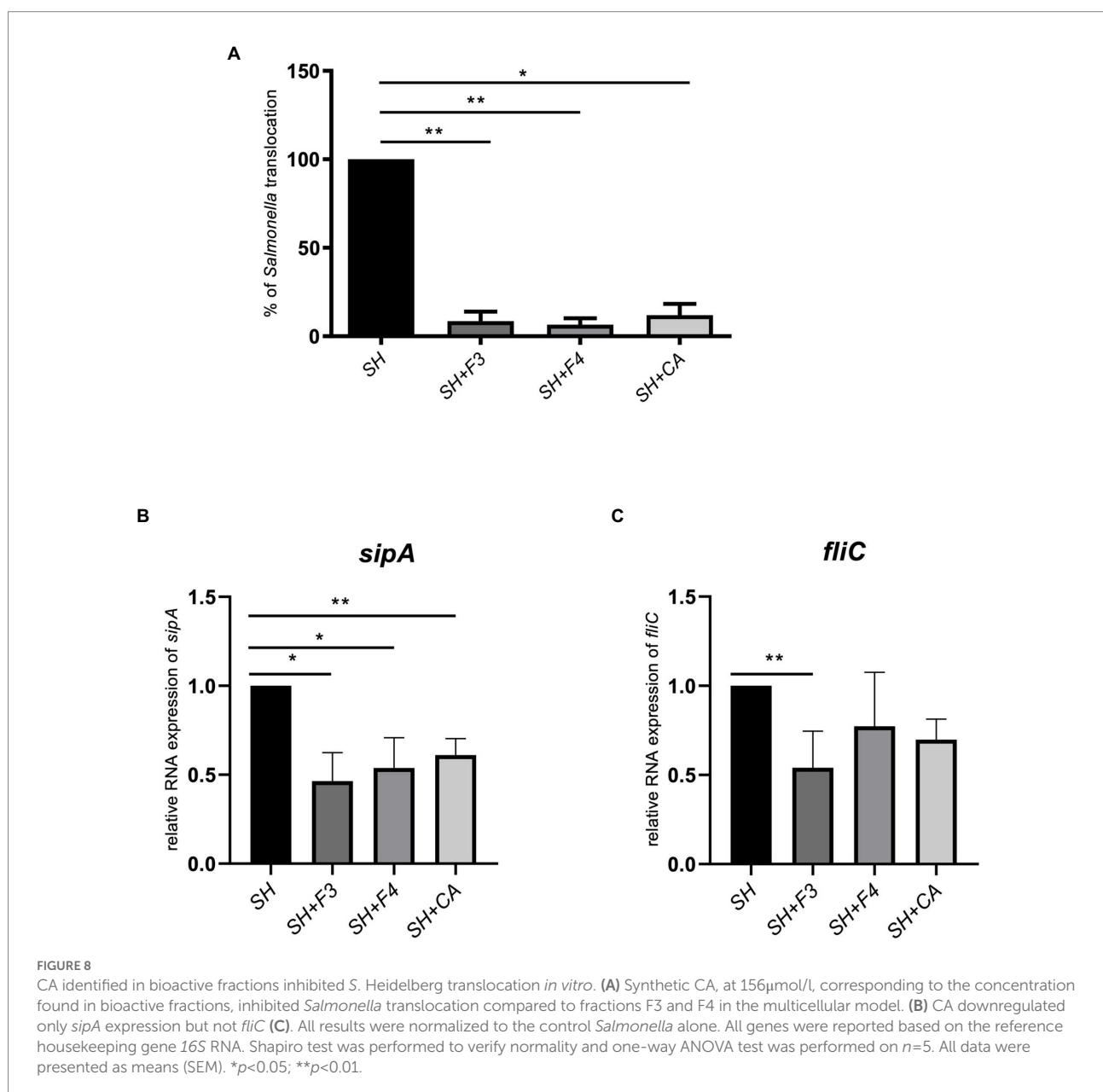
TNF- α) in the gut and in other organs (Huang et al., 2021; Peña-Rodríguez et al., 2022; Yue et al., 2022). Desaminotyrosine, produced by *Clostridium orbiscidens*, can protect against influenza virus infection by increasing the expression of IFN-I way (Steed et al., 2017; Wei et al., 2020). Other bacterial metabolites, BAs,

TABLE 2 Cholic acid (CA) quantification in supernatant (SN) and in bioactive fractions (F3, F4) after HPLC-ELSD (High-performance liquid chromatography- evaporative light scattering detector) analysis.

<i>Bacteroides fragilis</i> derivate	CA (mg/ml)	CA ($\mu\text{mol/l}$)
SN	0.064	156.0
F3	0.015	36.7
F4	0.008	19.6

have emerged as key signaling molecules, which participate in multiple metabolic and inflammatory pathways (Fiorucci et al., 2021; Thomas et al., 2022). BAs are the end-product of cholesterol metabolism generated in the liver by a chain of enzymatic reactions (Cai et al., 2022). These hepatic pathways generate mainly two primary BAs, i.e., CA and chenodeoxycholic acid (CDCA). These molecules are conjugated by taurine or glycine in the liver to form taurocholic acid (TCA) and glycocholic acid (GCA; Yang et al., 2021). In the colon, the unconjugated BAs are further transformed into secondary BAs, DCA, and lithocholic acid (LCA) via 7α -dehydroxylation.

It is known that an intact gut microbiota protects the host against infection by gastrointestinal pathogens by colonization resistance, by competition for nutrients and host receptors and by



secretion of antimicrobial substances (Yurist-Doutsch et al., 2014; Vogt et al., 2015; Peng et al., 2022). We have previously shown that the cell-free supernatant of *B. fragilis* inhibited the translocation of *S. Heidelberg* (Vernay et al., 2020). To better characterize the molecules present in this supernatant, we fractionated it by HPLC. Two fractions, F3 and F4, could inhibit *S. Heidelberg* translocation in a model mimicking an intestinal epithelium previously developed (Vernay et al., 2020) while they did not interfere with the growth of *S. Heidelberg*. Conversely, these bioactive fractions affected the expression of virulence-associated genes in this *S. Heidelberg*. SipA effector proteins are required for membrane ruffling and invasion of *Salmonella* into the host cell. Meanwhile, flagella (FliC) trigger rapid and efficient contact with the cells lining the epithelium, allowing *Salmonella* to penetrate the gastrointestinal mucus layer. As FliC and SipA play a key role in *Salmonella* pathogenesis, we have investigated the impact of F3 and F4 on their expression. We have shown that *sipA* was significantly inhibited in the presence of F3 and F4 whereas *fliC* was only significantly inhibited with F3. Besides, F5 which did not inhibit *Salmonella* translocation had no impact on *SipA* and *fliC* expression. A difference was detected in *fliC* expression between F3 and supernatant, suggesting that the bioactive molecules in F3 could be inactivated when they are in the supernatant probably due to the presence of other compounds. It has been shown in a study that the metabolite Bac70 purified from *Bacillus atrophaeus* supernatant has a better antimicrobial activity than supernatant itself (Sarjoughian et al., 2020). Several studies have shown that some strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* interfere with the ability of *Salmonella* Typhimurium to adhere to host cells (Yang et al., 2014; van Zyl et al., 2020; Kim et al., 2021). These probiotics produce compounds that do not have a direct bactericidal effect but contribute to anti-infectious activities by inhibiting the binding of pathogenic bacteria to the mucosal surface. Durant et al., 2000 showed that lactic acid affected the expression of the *hilA* and *invF* virulence factors of *Salmonella* (Durant et al., 2000). Liévin-Le Moal et al., 2011 demonstrated that *L. acidophilus* and its secreted products inhibited the entry of *S. enterica* serovar Typhimurium into human intestinal Caco-2 cells by disrupting the swimming motility of this pathogen (Liévin-Le Moal et al., 2011).

To demonstrate that the antagonistic activity of bioactive fractions against *S. Heidelberg* observed *in vitro* could also occur *in vivo*, *S. Heidelberg* was administered orally to mice. The infected mice receiving also bioactive fractions (mixture of F3 and F4) exhibited a significantly decrease of viable *S. Heidelberg* level in Peyer's Patches and spleen, showing that the bioactive fractions inhibited the spread (translocation) of *S. Heidelberg* in mice. Besides, the number of bacteria was not significantly different between groups receiving *Salmonella* alone or with fractions in feces and colon. The presence of *Salmonella* in the feces after treatment with the fractions showed that these fractions did not inhibit *Salmonella* growth but its translocation since no bacteria are present in the Peyer's patches. Taken together, these *in vivo* data reinforced the *in*

vitro results concerning the effect on translocation and not on *Salmonella* growth. In the presence of F3 and F4 fractions, *fliC* expression was downregulated. It is possible that the inhibition of *S. Heidelberg* motility delayed its translocation of *S. Heidelberg* across the intestinal barrier, thus maintaining *Salmonella* in gut lumen which is eliminated in feces.

In addition, these bioactive fractions are also associated with a decrease in inflammation, as shown by a reduced rate of neutrophils infiltration and a decrease in systemic cytokine concentrations. Neutrophils infiltrations, in mice receiving both *S. Heidelberg* and bioactive fractions are related to a decreased expression of GM-CSF and MCP-1, involved in the recruitment, differentiation, and proliferation of several immune cells (Bayoumi and Griffiths, 2010). Moreover, bioactive fractions attenuated the severity of *S. Heidelberg* infection in mice by decreasing the production of IL-1 β and IL12p70. Several studies have indicated that *B. fragilis* and its polysaccharide A (PSA) can alleviate intestinal inflammation in an animal model of colitis and confer protection against pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Clostridium difficile* (Deng et al., 2018; Eribo et al., 2022). This beneficial effect may be associated with the production of IL-10, as shown in colitis and viral infection (Cohen-Poradosu et al., 2011; Blandford et al., 2019; Ramakrishna et al., 2019). However, in our study, IL-10 was decreased but not significantly when *Salmonella* was combined with bioactive fractions. Several studies described that *Salmonella* could use IL-10 to disseminate in several organs. Thus, the decrease of IL-10 in the presence of the bioactive fractions may inhibit it, supporting our results concerning *S. Heidelberg* enumeration in spleen and Peyer's patches (Salazar et al., 2017). Besides, several studies suggested that commensal-derived extracellular products, in particular (PSA)-containing OMVs, isolated from *B. fragilis*, regularly maintain intestinal homeostasis, they are also known to have altered functions during infection and diseases to ensure host survival (Chu et al., 2016; Durant et al., 2020; Engevik et al., 2021; Gul et al., 2022). We can speculate that fractions, in the infection with pathogenic bacteria, can have altered role in IL-10 regulation. Other probiotic strains such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* also decreased inflammation *in vivo*. Sagheddu et al., 2020 and Jenab et al., 2020 indicated that natural compounds of these strains decreased inflammation (Jenab et al., 2020; Sagheddu et al., 2020).

By investigating gut microbiota in mice, we have shown that administration of *S. Heidelberg* alters the diversity of the microbiota as described in several studies, but that administration of bioactive fractions does not cause an alteration in the alpha and beta intestinal diversities (Khan and Chousalkar, 2020). The results suggested that bioactive fractions only target the virulence of *S. Heidelberg* without disrupting other gut phyla. Nevertheless, we have demonstrated that at the genus level, *Alistipes* were decreased in the presence of the bioactive fractions whereas *Roseburia*, known to have anti-inflammatory properties (Tamanai-Shacoori et al., 2017), was not significantly decreased. *Alistipes* spp. are described in

dysbiosis associated with increased intestinal inflammation and depression (Parker et al., 2020; Wu et al., 2021; Zheng et al., 2021). The *Alistipes* genus is a well-known stress target in rodents and humans (Li et al., 2017). Recent studies have shown that lipopolysaccharides (LPS) of *Alistipes* can be pro-inflammatory (Parker et al., 2020). However, the *Alistipes* genus includes several species with anti-inflammatory properties by producing sulfonolipids (SLs), a type of sphingolipid that has anti-inflammatory effects by suppressing the activation of cytokines such as TNF- α in mice (Walker et al., 2017). The decrease of *Alistipes* abundance in mice that received the fractions can explain the anti-inflammatory effects of the bioactive fractions (as indicated by IL1- β decrease, Figure 4) or the anti-stress effect, which needs to be investigated. As these bioactive fractions do not significantly modify the fecal microbiota diversities, they can be considered to treat *Salmonella* infections without damaging the commensal flora in contrary to the conventional antibiotic treatment or approach (Ogawa et al., 2020; Ramirez et al., 2020).

In this study, in mice receiving both bioactive fractions of *B. fragilis* and *Salmonella*, the expression of *cldn-1* and *occludin* in the colon was significantly increased compared to *Salmonella* alone, suggesting an improvement in the intestinal barrier. In the presence of the bioactive fractions alone, only *cldn-1* was upregulated. It was already described that *B. fragilis* NTBF ZY-312 induced *occludin* over-expression in mice with AAD (Antibiotics Associated Diarrhea). In addition, Wang et al., 2021 showed that *B. fragilis* NTCC 9343 increased the expression of the tight-junction proteins ZO-1, occludin and claudin-1 in the colon against DSS-induced ulcerative colitis, whereas the *B. fragilis* strain FJSWX11BF played no protective role (Wang et al., 2021). However, in both of these studies, the bacterial compounds implicated in this regulation were not identified as they used only live bacteria.

To identify *B. fragilis* metabolites contributing to the improvement of host health, we have used LC-MS/MS and molecular networking analysis. Our data indicated that these bioactive fractions of *B. fragilis* contained identified metabolites, CA and DCA, among many other compounds that were not identified by comparison against GNPS spectral libraries. In the intestinal tract, numerous gut bacteria exhibit bile salt hydrolase (BSH) enzymatic activity responsible for bile acid (BA) deconjugation, and subsequently forming secondary BAs metabolites, such as DCAs (Gérard et al., 2007; Yang et al., 2021; Guo et al., 2022). BSH has been identified in extensive bacterial genera, including *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* and *Enterococcus* (Song et al., 2019). The BSH enzyme was identified in the *B. fragilis* ATCC 25285 strain that we have used in this study by analyzing its genome (NCBI accession: NC_003228.3) with the Genious software (data not shown). *Bacteroides fragilis* can deconjugate the bile salts GCA, TCA to release CA but also the bile salts glycodeoxycholic acid (GDCA) and taurodeoxycholic acid (TCDA) to produce DCA. After quantifying each bioactive

fraction, CA was tested *in vitro* for its ability to inhibit *S. Heidelberg* translocation. As the bioactive fractions, CA can reduce virulence by inhibiting *sipA* but not *fliC* expression. Sievers et al., 2019 showed that CA did not decrease *fliC* in *Clostridium difficile* infection in contrast to DCA (Sievers et al., 2019). Eade et al., 2016 indicated that bile acids comprising CA and DCA directly impact *sipC*, *sopB*, and *hilD* expression with a synergic effect of CA and DCA administration (Eade et al., 2016). Several studies demonstrated that CA is more active when conjugated to *N*-methyl benzimidazole or with alkyl chains of varied hydrophobicity (Yadav et al., 2019; Kakkar et al., 2022). Besides, as DCA could not be quantified in our study, we can speculate that other molecule (s) not identified in the database could downregulate *fliC* (Sievers et al., 2019; Metzendorf et al., 2022).

However, this study had some limitations. Experiments were performed in laboratory conditions, which did not fully reflect the complexity of the human gut and the environment that a commensal bacterium may have to play its beneficial role. Moreover, more studies on complete DMEM containing 20% of serum are required to understand the mechanisms implicated in CA formation in the presence of *B. fragilis*. Besides using mice model can be considered as the other limitation of the study. Mouse and human are quite similar in physiology and anatomical structures, and this is one of the reasons why mouse models have been widely used in biomedical studies. However, the anatomy of the mouse and human intestinal tract also have prominent differences, which might be shaped by their diverging diets, feeding patterns, body sizes and metabolic requirements (Nguyen et al., 2015; Xiao et al., 2015). Overall, the gut microbiota of human and mice are dominated by two major phyla, *Bacteroidota* and *Bacillota* and 85% of bacterial genera found in the mouse gut microbiota are not present in human (Ley et al., 2005).

To conclude, we showed for the first time that *B. fragilis* NTBF, ATCC 25285, produced CA and unidentified molecule(s) inhibiting *Salmonella* virulence factors expression such as *fliC* and *sipA* belonging to the T3SS system. These potential molecules prevent the dissemination of *Salmonella* in target organs such as the spleen and Peyer's patches. The use of bioactive fractions to target the T3SS system will reduce the virulence of *Salmonella* without inducing stress on the bacteria and thus will limit the emergence of antibiotic resistance. Therefore, targeting the T3SS system with bioactive fractions can be an alternative approach to fighting pathogenic bacteria.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at: NCBI—PRJNA876074.

Ethics statement

All experimental protocols were approved by the Adaptive Therapeutics Animal Care and Use Committee (APAFIS#31484–2,021,050,308,355,787 v6).

Author contributions

OL, ST, and LB conceptualized and designed the study. TG, NO, SF, PP, AS, PL, IC, SG, and SD performed experiments and acquired data. TG and LB analyzed and interpreted the data; drafted the manuscript and created figures; and edited the manuscript. AS participated in English correction. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by the French National Institute for Health and Medical Research (Inserm-Transfert, Preuve de Concept) with two grants N°R19053NS in 2019 and N° R21001NS in 2020.

References

- Antunes, L. C. M., McDonald, J. A. K., Schroeter, K., Carlucci, C., Ferreira, R. B. R., Wang, M., et al. (2014). Antivirulence activity of the human gut metabolome. *MBio* 5, e01183–e01114. doi: 10.1128/mBio.01183-14
- Bayoumi, M. A., and Griffiths, M. W. (2010). Probiotics Down-regulate genes in salmonella enterica Serovar typhimurium Pathogenicity Islands 1 and 2. *J. Food Prot.* 73, 452–460. doi: 10.4315/0362-028X-73.3.452
- Blandford, L. E., Johnston, E. L., Sanderson, J. D., Wade, W. G., and Lax, A. J. (2019). Promoter orientation of the immunomodulatory *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharide a (PSA) is off in individuals with inflammatory bowel disease (IBD). *Gut Microbes* 10, 569–577. doi: 10.1080/19490976.2018.1560755
- Blázquez, J. (2003). Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin. Infect. Dis.* 37, 1201–1209. doi: 10.1086/378810
- Cai, J., Sun, L., and Gonzalez, F. J. (2022). Gut microbiota-derived bile acids in intestinal immunity, inflammation, and tumorigenesis. *Cell Host Microbe* 30, 289–300. doi: 10.1016/j.chom.2022.02.004
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., and Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
- Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., et al. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 30, 918–920. doi: 10.1038/nbt.2377
- Choi, V. M., Herrou, J., Hecht, A. L., Teoh, W. P., Turner, J. R., Crosson, S., et al. (2016). Activation of *Bacteroides fragilis* toxin by a novel bacterial protease contributes to anaerobic sepsis in mice. *Nat. Med.* 22, 563–567. doi: 10.1038/nm.4077
- Chu, H., Khosravi, A., Kusumawardhani, I. P., Kwon, A. H. K., Vasconcelos, A. C., Cunha, L. D., et al. (2016). Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* 352, 1116–1120. doi: 10.1126/science.aad9948
- Cohen-Poradosu, R., McLoughlin, R. M., Lee, J. C., and Kasper, D. L. (2011). *Bacteroides fragilis*-stimulated Interleukin-10 contains expanding disease. *J. Infect. Dis.* 204, 363–371. doi: 10.1093/infdis/jir277
- Deng, H., Li, Z., Tan, Y., Guo, Z., Liu, Y., Wang, Y., et al. (2016). A novel strain of *Bacteroides fragilis* enhances phagocytosis and polarises M1 macrophages. *Sci. Rep.* 6:29401. doi: 10.1038/srep29401
- Deng, H., Yang, S., Zhang, Y., Qian, K., Zhang, Z., Liu, Y., et al. (2018). *Bacteroides fragilis* prevents *Clostridium difficile* infection in a mouse model by restoring gut barrier and microbiome regulation. *Front. Microbiol.* 9:2976. doi: 10.3389/fmicb.2018.02976
- Diaz-Garrido, N., Badia, J., and Baldomà, L. (2021). Microbiota-derived extracellular vesicles in interkingdom communication in the gut. *J. Extracell. Vesicles* 10:e12161. doi: 10.1002/jev2.12161
- Durant, J. A., Corrier, D. E., and Ricke, S. C. (2000). Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the hilA and invF genes of salmonella typhimurium. *J. Food Prot.* 63, 573–578. doi: 10.4315/0362-028X-63.5.573
- Durant, L., Stentz, R., Noble, A., Brooks, J., Gicheva, N., Reddi, D., et al. (2020). *Bacteroides thetaiotaomicron*-derived outer membrane vesicles promote regulatory dendritic cell responses in health but not in inflammatory bowel disease. *Microbiome* 8:88. doi: 10.1186/s40168-020-00868-z
- Eade, C. R., Hung, C.-C., Bullard, B., Gonzalez-Escobedo, G., Gunn, J. S., and Altier, C. (2016). Bile acids function synergistically to repress invasion gene expression in salmonella by destabilizing the invasion regulator HilD. *Infect. Immun.* 84, 2198–2208. doi: 10.1128/IAI.00177-16
- Engevik, M. A., Danhof, H. A., Ruan, W., Engevik, A. C., Chang-Graham, A. L., Engevik, K. A., et al. (2021). *Fusobacterium nucleatum* secretes outer membrane vesicles and promotes intestinal. *Inflammation* 12, e02706–e02720. doi: 10.1128/mBio.02706-20
- Eribo, O. A., du Plessis, N., and Chegou, N. N. (2022). The intestinal commensal, *Bacteroides fragilis*, modulates host responses to viral infection and therapy: lessons for exploration during mycobacterium tuberculosis infection. *Infect. Immun.* 90:e0032121. doi: 10.1128/IAI.00321-21
- Fiorucci, S., Carino, A., Baldoni, M., Santucci, L., Costanzi, E., Graziosi, L., et al. (2021). Bile acid signaling in inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis. Sci.* 66, 674–693. doi: 10.1007/s10620-020-06715-3
- Gérard, P., Lepercq, P., Leclerc, M., Gavini, F., Raibaud, P., and Juste, C. (2007). *Bacteroides* sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5742–5749. doi: 10.1128/AEM.02806-06

Acknowledgments

We would like to acknowledge C. Le Lann, and A. Bodin (NUMECAN – Rennes I university) for their technical assistance in mice model and Victorien Voisin for his internship studying fractions. The authors thank Pascale Bellaud (H2P2 facility, SFR Biosit-UMS CNRS 3480-INSERM 018) for technical help with H&E staining.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

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

- Gul, L., Modos, D., Fonseca, S., Madgwick, M., Thomas, J. P., Sudhakar, P., et al. (2022). Extracellular vesicles produced by the human commensal gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* affect host immune pathways in a cell-type specific manner that are altered in inflammatory bowel disease. *J. of Extracellular Vesicle* 11:e12189. doi: 10.1002/jev2.12189
- Guo, X., Okpara, E. S., Hu, W., Yan, C., Wang, Y., Liang, Q., et al. (2022). Interactive relationships between intestinal Flora and Bile acids. *Int. J. Mol. Sci.* 23:8343. doi: 10.3390/ijms23158343
- Hayward, R. D., and Koronakis, V. (2002). Direct modulation of the host cell cytoskeleton by salmonella actin-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 12, 15–20. doi: 10.1016/s0962-8924(01)02183-3
- Hove, P. R., Nealon, N. J., Chan, S. H. J., Boyer, S. M., Haberecht, H. B., and Ryan, E. P. (2020). Metabolomics and proteomics of *L. rhamnosus* GG and *E. coli* Nissle probiotic supernatants identify distinct pathways that mediate growth suppression of antimicrobial-resistant pathogens. *Microbiology*. doi: 10.1101/2020.12.21.423897
- Huang, X., Oshima, T., Tomita, T., Fukui, H., and Miwa, H. (2021). Butyrate alleviates cytokine-induced barrier dysfunction by modifying Claudin-2 levels. *Biology* 10:205. doi: 10.3390/biology10030205
- Jenab, A., Roghanian, R., and Emtiaz, G. (2020). Bacterial natural compounds with anti-inflammatory and immunomodulatory properties (mini review). *Drug Des Dev Ther.* 14, 3787–3801. doi: 10.2147/DDDT.S261283
- Kakkar, H., Chaudhary, N., Mehta, D., Saini, V., Maheshwari, S., Singh, J., et al. (2022). N-methyl Benzimidazole tethered Cholic acid Amphiphiles can Eradicate *S. aureus*-mediated biofilms and wound infections. *Molecules* 27:3501. doi: 10.3390/molecules27113501
- Khan, S., and Chousalkar, K. K. (2020). Salmonella typhimurium infection disrupts but continuous feeding of bacillus based probiotic restores gut microbiota in infected hens. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11:29. doi: 10.1186/s40104-020-0433-7
- Kim, B. S., Yun, C.-H., Han, S. H., Song, K.-D., and Kang, S.-S. (2021). Inhibitory effect of Lipoteichoic acid derived from three lactobacilli on Flagellin-induced IL-8 production in porcine peripheral blood mononuclear cells. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 13, 72–79. doi: 10.1007/s12602-020-09682-3
- Le Bars, H., Le Gall-David, S., Renoux, V. M., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A., and Bousarghin, L. (2012). Impact of a mutator phenotype on motility and cell adherence in salmonella Heidelberg. *Vet. Microbiol.* 159, 99–106. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.025
- Le Gall, S., Desbordes, L., Gracieux, P., Saffroy, S., Bousarghin, L., Bonnaure-Mallet, M., et al. (2009). Distribution of mutation frequencies among salmonella enterica isolates from animal and human sources and genetic characterization of a salmonella Heidelberg hypermutator. *Vet. Microbiol.* 137, 306–312. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.023
- Le Gall-David, S., Zenbaa, N., Bouchard, D., Lavault, M.-T., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A., et al. (2015). Hypermutator salmonella Heidelberg induces an early cell death in epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 180, 65–74. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.034
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11070–11075. doi: 10.1073/pnas.0504978102
- Li, G., Lin, J., Zhang, C., Gao, H., Lu, H., Gao, X., et al. (2021). Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 13:1968257. doi: 10.1080/19490976.2021.1968257
- Li, Z., Quan, G., Jiang, X., Yang, Y., Ding, X., Zhang, D., et al. (2018). Effects of metabolites derived from gut microbiota and hosts on pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:314. doi: 10.3389/fcimb.2018.00314
- Li, S., Wang, Z., Yang, Y., Yang, S., Yao, C., Liu, K., et al. (2017). Lachnospiraceae shift in the microbial community of mice faecal sample effects on water immersion restraint stress. *AMB Express* 7:82. doi: 10.1186/s13568-017-0383-4
- Liévin-Le Moal, V., Amsellem, R., and Servin, A. L. (2011). Impairment of swimming motility by Antidiarrheic lactobacillus acidophilus strain LB retards internalization of salmonella enterica Serovar typhimurium within human enterocyte-like cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4810–4820. doi: 10.1128/AAC.00418-11
- Metzendorf, N. G., Lange, L. M., Lainer, N., Schlüter, R., Dittmann, S., Paul, L.-S., et al. (2022). Destination and specific impact of different bile acids in the intestinal pathogen *Clostridioides difficile*. *Front. Microbiol.* 13:814692. doi: 10.3389/fmicb.2022.814692
- Nguyen, T. L. A., Vieira-Silva, S., Liston, A., and Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis. Model. Mech.* 8, 1–16. doi: 10.1242/dmm.017400
- Nie, K., Ma, K., Luo, W., Shen, Z., Yang, Z., Xiao, M., et al. (2021). Roseburia intestinalis: a beneficial gut organism from the discoveries in genus and species. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:757718. doi: 10.3389/fcimb.2021.757718
- Okawa, Y., Miyoshi, C., Obana, N., Yajima, K., Hotta-Hirashima, N., Ikkyu, A., et al. (2020). Gut microbiota depletion by chronic antibiotic treatment alters the sleep/wake architecture and sleep EEG power spectra in mice. *Sci. Rep.* 10:19554. doi: 10.1038/s41598-020-76562-9
- Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M., and Rodriguez-Palacios, A. (2020). The genus *Alistipes*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Front. Immunol.* 11:906. doi: 10.3389/fimmu.2020.00906
- Peixoto, R. J. M., Alves, E. S., Wang, M., Ferreira, R. B. R., Granato, A., Han, J., et al. (2017). Repression of salmonella host cell invasion by aromatic small molecules from the human fecal metabolome. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e01148–e01117. doi: 10.1128/AEM.01148-17
- Peña-Rodríguez, M., Vega-Magaña, N., García-Benavides, L., Zepeda-Nuño, J. S., Gutierrez-Silerio, G. Y., González-Hernández, L. A., et al. (2022). Butyrate administration strengthens the intestinal epithelium and improves intestinal dysbiosis in a cholestasis fibrosis model. *J. Appl. Microbiol.* 132, 571–583. doi: 10.1111/jam.15135
- Peng, X., Ed-Dra, A., Song, Y., Elbediwi, M., Nambiar, R. B., Zhou, X., et al. (2022). *Lactocaseibacillus rhamnosus* alleviates intestinal inflammation and promotes microbiota-mediated protection against salmonella fatal infections. *Front. Immunol.* 13:973224. doi: 10.3389/fimmu.2022.973224
- Piqué, N., Berlanga, M., and Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: an overview. *IJMS* 20:2534. doi: 10.3390/ijms20102534
- Postler, T. S., and Ghosh, S. (2017). Understanding the Holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Cell Metab.* 26, 110–130. doi: 10.1016/j.cmet.2017.05.008
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Ramakrishna, C., Kujawski, M., Chu, H., Li, L., Mazmanian, S. K., and Cantin, E. M. (2019). *Bacteroides fragilis* polysaccharide induces IL-10 secreting B and T cells that prevent viral encephalitis. *Nat. Commun.* 10:2153. doi: 10.1038/s41467-019-09884-6
- Ramirez, J., Guarner, F., Bustos Fernandez, L., Maruy, A., Sdepanian, V. L., and Cohen, H. M. (2019). Antibiotics as major disruptors of gut microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:572912. doi: 10.3389/fcimb.2020.572912
- Reid, G., Jass, J., Sebalsky, M. T., and McCormick, J. K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 658–672. doi: 10.1128/cmr.16.4.658-672.2003
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584
- Saggheddu, V., Uggeri, F., Belogi, L., Remollino, L., Brun, P., Bernabè, G., et al. (2020). The biotherapeutic potential of lactobacillus reuteri characterized using a target-specific selection process. *Front. Microbiol.* 11:532. doi: 10.3389/fmicb.2020.00532
- Salazar, G. A., Peñaloza, H. F., Pardo-Roa, C., Schultz, B. M., Muñoz-Durango, N., Gómez, R. S., et al. (2017). Interleukin-10 production by T and B cells is a key factor to promote systemic *Salmonella enterica* Serovar typhimurium infection in mice. *Front. Immunol.* 8:889. doi: 10.3389/fimmu.2017.00889
- Sarjoughian, M. R., Abolmaali, S., and Astaneh, S. D. A. (2020). Bioactivity of Bac70 produced by *Bacillus atrophaeus* strain DDBCC70. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 12:8.
- Schmidt, E. J., Boswell, J. S., Walsh, J. P., Schellenberg, M. M., Winter, T. W., Li, C., et al. (2001). Activities of cholic acid-derived antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 671–674. doi: 10.1093/jac/47.5.671
- Sears, C. L., Geis, A. L., and Housseau, F. (2014). *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. *J. Clin. Investig.* 124, 4166–4172. doi: 10.1172/JCI72334
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
- Sievers, S., Metzendorf, N. G., Dittmann, S., Troitzsch, D., Gast, V., Tröger, S. M., et al. (2019). Differential view on the bile acid stress response of *Clostridioides difficile*. *Front. Microbiol.* 10:258. doi: 10.3389/fmicb.2019.00258
- Silva, J. P. B., Navegantes-Lima, K. C., Oliveira, A. L. B., Rodrigues, D. V. S., Gaspar, S. L. F., Monteiro, V. V. S., et al. (2018). Protective mechanisms of butyrate on inflammatory bowel disease. *Curr. Pharm. Des.* 24, 4154–4166. doi: 10.2174/1381612824666181001153605
- Sittipo, P., Shim, J., and Lee, Y. (2019). Microbial metabolites determine host health and the status of some diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20:5296. doi: 10.3390/ijms2015296

- Song, Z., Cai, Y., Lao, X., Wang, X., Lin, X., Cui, Y., et al. (2019). Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome* 7:9. doi: 10.1186/s40168-019-0628-3
- Steed, A. L., Christophi, G. P., Kaiko, G. E., Sun, L., Goodwin, V. M., Jain, U., et al. (2017). The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science* 357, 498–502. doi: 10.1126/science.aam5336
- Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., et al. (2017). *Roseburia* spp.: a marker of health? *Future Microbiol.* 12, 157–170. doi: 10.2217/fmb-2016-0130
- Thomas, J. P., Modos, D., Rushbrook, S. M., Powell, N., and Korcsmaros, T. (2022). The emerging role of bile acids in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.* 13:829525. doi: 10.3389/fimmu.2022.829525
- van Zyl, W. F., Deane, S. M., and Dicks, L. M. T. (2020). Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut Microbes* 12:1831339. doi: 10.1080/19490976.2020.1831339
- Vernay, T., Cannie, I., Gaboriau, F., Gall, S. D.-L., Tamanai-Shacoori, Z., Burel, A., et al. (2020). *Bacteroides fragilis* prevents salmonella Heidelberg translocation in co-culture model mimicking intestinal epithelium. *Benef Microbes* 11, 391–401. doi: 10.3920/BM2020.0004
- Vogt, S. L., Peña-Díaz, J., and Finlay, B. B. (2015). Chemical communication in the gut: effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe* 34, 106–115. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.05.002
- Walker, A., Pfitzner, B., Harir, M., Schaubek, M., Calasan, J., Heinzmann, S. S., et al. (2017). Sulfonolipids as novel metabolite markers of *Alistipes* and *Odoribacter* affected by high-fat diets. *Sci. Rep.* 7:11047. doi: 10.1038/s41598-017-10369-z
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., et al. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. *Nat. Biotechnol.* 34, 828–837. doi: 10.1038/nbt.3597
- Wang, Y., Deng, H., Li, Z., Tan, Y., Han, Y., Wang, X., et al. (2017). Safety evaluation of a novel strain of *Bacteroides fragilis*. *Front. Microbiol.* 8:435. doi: 10.3389/fmicb.2017.00435
- Wang, C., Li, S., Hong, K., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., et al. (2021). The roles of different *Bacteroides fragilis* strains in protecting against DSS-induced ulcerative colitis and related functional genes. *Food Funct.* 12, 8300–8313. doi: 10.1039/d1fo00875g
- Wei, Y., Gao, J., Kou, Y., Liu, M., Meng, L., Zheng, X., et al. (2020). The intestinal microbial metabolite desaminotyrosine is an anti-inflammatory molecule that modulates local and systemic immune homeostasis. *FASEB J.* 34, 16117–16128. doi: 10.1096/fj.201902900RR
- Wexler, H. M. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 593–621. doi: 10.1128/CMR.00008-07
- Wilmschurst, P., and Sutcliffe, H. (1995). Splenic abscess due to *Salmonella heidelberg*. *Clin. Infect. Dis.* 21, 1065–1066. doi: 10.1093/clinids/21.4.1065
- Wu, L., Han, Y., Zheng, Z., Zhu, S., Chen, J., Yao, Y., et al. (2021). Obeticholic acid inhibits anxiety via alleviating gut microbiota-mediated microglia accumulation in the brain of high-fat high-sugar diet mice. *Nutrients* 13:940. doi: 10.3390/nu13030940
- Xiao, L., Feng, Q., Liang, S., Sonne, S. B., Xia, Z., Qiu, X., et al. (2015). A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat. Biotechnol.* 33, 1103–1108. doi: 10.1038/nbt.3353
- Yadav, K., Yavvari, P. S., Pal, S., Kumar, S., Mishra, D., Gupta, S., et al. (2019). Oral delivery of Cholic acid-derived Amphiphile helps in combating salmonella-mediated gut infection and inflammation. *Bioconj. Chem.* 30, 721–732. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00880
- Yang, X., Brisbin, J., Yu, H., Wang, Q., Yin, F., Zhang, Y., et al. (2014). Selected lactic acid-producing bacterial isolates with the capacity to reduce salmonella translocation and virulence gene expression in chickens. *PLoS One* 9:e93022. doi: 10.1371/journal.pone.0093022
- Yang, M., Gu, Y., Li, L., Liu, T., Song, X., Sun, Y., et al. (2021). Bile acid-gut microbiota Axis in inflammatory bowel disease: from bench to bedside. *Nutrients* 13:3143. doi: 10.3390/nu13093143
- Yue, X., Wen, S., Long-kun, D., Man, Y., Chang, S., Min, Z., et al. (2022). Three important short-chain fatty acids (SCFAs) attenuate the inflammatory response induced by 5-FU and maintain the integrity of intestinal mucosal tight junction. *BMC Immunol.* 23:19. doi: 10.1186/s12865-022-00495-3
- Yurist-Doutsch, S., Arrieta, M.-C., Vogt, S. L., and Finlay, B. B. (2014). Gastrointestinal microbiota-mediated control of enteric pathogens. *Annu. Rev. Genet.* 48, 361–382. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092421
- Zhang, K., Riba, A., Nietschke, M., Torow, N., Repnik, U., Pütz, A., et al. (2018). Minimal SPII-T3SS effector requirement for salmonella enterocyte invasion and intracellular proliferation in vivo. *PLoS Pathog.* 14:e1006925. doi: 10.1371/journal.ppat.1006925
- Zheng, S., Zhu, Y., Wu, W., Zhang, Q., Wang, Y., Wang, Z., et al. (2021). A correlation study of intestinal microflora and first-episode depression in Chinese patients and healthy volunteers. *Brain Behav.* 11:e02036. doi: 10.1002/brb3.2036

IV) *Roseburia intestinalis* module l'expression de PYY dans un nouveau modèle quadri-cellulaire comprenant des cellules entéro-endocrines

Comme il a été montré précédemment que les potentiels PNGs sont impliqués dans la protection contre la virulence des bactéries pathogènes (article 1). Les bactéries intestinales sont également impliquées dans le maintien des fonctions métaboliques de l'épithélium intestinal.

Un dysfonctionnement du métabolisme intestinal peut amener à des pathologies comme l'obésité et le DT2. Une partie des désordres métaboliques peut être expliquée par un taux de l'hormone PYY et un taux de l'hormone GLP-1 circulants diminués dans l'obésité et le DT2 (367,368). Le peptide PYY est une hormone libérée par les cellules entéro-endocrines intestinales, qui lorsqu'elle est libérée, se retrouve dans la circulation sanguine. Après fixation sur son récepteur dans l'hypothalamus, PYY induit une sensation de satiété pendant plusieurs heures. GLP-1 est une hormone également libérée par les cellules entéro-endocrines intestinales, qui rejoint le pancréas et se fixe sur les cellules β du pancréas, induisant la libération de l'insuline, ce qui permet de réduire la glycémie dans le sang. L'action de GLP-1 induit également une diminution de la prise alimentaire, par action sur l'hypothalamus.

Le DT2 et l'obésité sont aussi des pathologies associées à une dysbiose. De nombreuses études montrent que les potentiels PNGs comme *B. fragilis* et *R. intestinalis* sont diminuées dans le cas de DT2 et d'obésité (172,173,186,194,195) (tableau 1).

Ainsi, l'hypothèse qui alimente le second axe de la thèse, est de savoir si *R. intestinalis* et *B. fragilis* peuvent induire une régulation de la sécrétion de PYY et GLP-1, via les cellules entéro-

endocrines, et de déterminer si ces bactéries produisent des métabolites responsables de cette régulation.

Les hormones PYY et GLP-1 sont sécrétées par les cellules entéro-endocrines intestinales (369). Or, les cellules entéro-endocrines ne sont pas présentes sur le modèle tri-cellulaire que nous avons utilisé et décrit au cours du premier axe de la thèse.

Plusieurs étapes ont été suivies pour vérifier notre hypothèse :

Etape 1) Mise en place du modèle quadri-cellulaire

Afin de rajouter la fonction endocrine sur le modèle tri-cellulaire, un modèle quadri-cellulaire, incluant une lignée de cellules entéro-endocrines NCI-H716, a été mis au point. Le modèle quadri-cellulaire comprend la lignée cellulaire CaCo-2 (entérocytes), la lignée cellulaire HT29-MTX (cellules de Gobelet), la lignée cellulaire NCI-H716 différenciée (cellules entéro-endocrines), ainsi que les cellules M. La présence des différentes lignées cellulaires, après 21 jours de culture, a été vérifiée en RT-qPCR, par analyse des gènes caractéristiques des 4 lignées cellulaires utilisées (figure 25). L'intégrité du modèle quadri-cellulaire a été vérifiée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER).

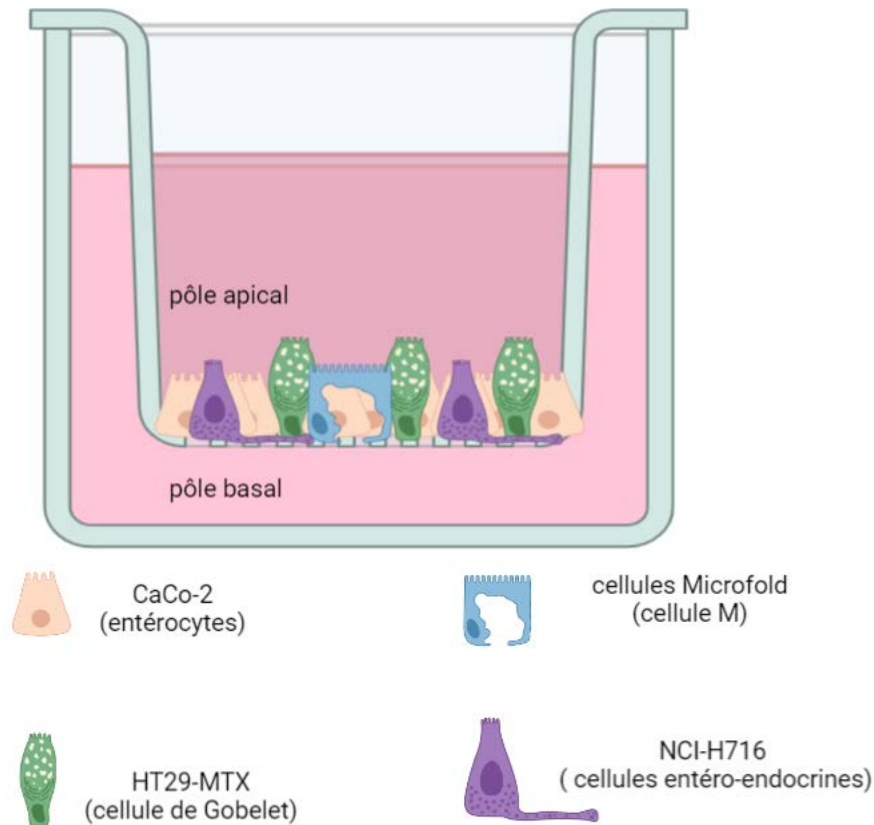


Figure 25 : Le modèle quadri-cellulaire. La mise en place du modèle quadri-cellulaire est la même que celle du modèle tri-cellulaire (figure 22). Seule la fonction endocrine est ajoutée, avec les cellules de la lignée NCI-H716 (cellules entéro-endocrines). Les NCI-H716, sont ajoutées sur insert Transwell®. La différenciation des NCI-H716 s'effectue à l'aide de Matrigel, et après deux jours de culture, les autres cellules sont ajoutées et la co-culture se poursuit jusqu'à J14. Les Raji-B sont ensuite ajoutées pour différencier les entérocytes en cellules M. Le modèle est mature au bout de 21 jours (Figure créée à partir de Biorender).

Etape 2) Caractérisation des AGCC courtes produits par *R. intestinalis* et *B. fragilis* dans le milieu DMEM complet

En parallèle, la croissance de *R. intestinalis* a été étudiée dans le milieu DMEM complet, contenant du DMEM, du sérum de veau fœtal (20%) et de la glutamine 1%. Dans ce même milieu de culture, la sécrétion des AGCC caractéristique de *R. intestinalis* (butyrate) et *B. fragilis* (propionate et butyrate), a été évaluée par des analyses de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). L'objectif de ces analyses était de caractériser le profil de sécrétion

et la concentration d'AGCC, pour les deux bactéries, dans le milieu DMEM complet, en vue d'une stimulation du modèle quadri-cellulaire, par leurs surnageants de culture. Les données ont montré que dans le milieu de culture, *B. fragilis* produit en majorité du propionate et une faible concentration de butyrate, tandis que *R. intestinalis* produit une forte quantité de butyrate mais ne produit pas du tout de propionate. Ainsi, nous avons montré que les deux bactéries avaient conservé leurs voies métaboliques dans le milieu DMEM complet.

Etape 3) Etude de l'impact du surnageant de *B. fragilis* et *R. intestinalis* sur les fonctions métaboliques du modèle quadri-cellulaire

R. intestinalis est une bactérie anaérobie stricte, sa culture sur cellules eucaryotes sous CO₂ et O₂ est donc impossible. Ce sont donc les surnageants de *R. intestinalis* et *B. fragilis* qui ont été incubés indépendamment, en présence du modèle quadri-cellulaire, pendant une durée de 24h. De plus, les AGCC majoritaires, sécrétés respectivement par *B. fragilis* (propionate) et *R. intestinalis* (butyrate) ont été incubés sur le modèle quadri-cellulaire. Les concentrations de propionate et butyrate synthétique ont été ajustées, afin d'imiter les mêmes concentrations retrouvées dans le surnageant de *R. intestinalis* et *B. fragilis*. Les quatre conditions ont été testées de manière indépendante. Les résultats ont révélé que le surnageant de *R. intestinalis* induisait une stimulation significative de l'expression de *PYY*, mais pas de *GLP-1*. Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, le butyrate à la même concentration, n'a pas induit d'augmentation de l'expression de *PYY* (370). Le surnageant de *B. fragilis*, ainsi que le propionate n'ont pas induit de changements de l'expression de *GLP-1* et *PYY*. Contrairement au surnageant de *R. intestinalis*, le surnageant de *B. fragilis* ne semble pas impliqué dans le mécanisme de stimulation des hormones produites par les cellules entéro-endocrines. En revanche, l'intégrité du modèle quadri-cellulaire, mesurée par la TEER, a été améliorée en présence des deux surnageants de culture.

Ces données montrent que des métabolites non identifiés, produits par *R. intestinalis* pourraient réguler la sécrétion de PYY. L'identification du (des) métabolite(s) produit(s) par *R. intestinalis*, indépendamment du butyrate, impliqué(s) dans la stimulation de l'hormone PYY, pourrai(en)t par la suite être identifié(s) par LC-MS/MS. Ces résultats permettraient ainsi de comprendre les mécanismes d'action mis en jeu entre *R. intestinalis* et les cellules entéro-endocrines. Suite à cette étude, l'hypothèse d'un traitement, par administration de *R. intestinalis*, comme potentiel PNG, ou de ses métabolites, pourrait être mis en place dans le cas de pathologies comme l'obésité ou le DT2. Cependant, les analyses *in vivo* sont nécessaires pour confirmer les résultats observés.



Article

Roseburia intestinalis Modulates PYY Expression in a New a Multicellular Model including Enteroendocrine Cells

Thomas Gautier ¹, Nelly Fahet ¹, Zohreh Tamanai-Shacoori ¹, Nolwenn Olivier ¹, Marielle Blot ², Aurélie Sauvager ², Agnes Burel ³, Sandrine David-Le Gall ¹, Sophie Tomasi ², Sophie Blat ¹ and Latifa Bousarghin ^{1,*}

¹ Institut NUMECAN, INSERM, Univ Rennes, INRAE, F-35000 Rennes, France

² ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes)-UMR CNRS 6226, Univ Rennes, CNRS, F-35000 Rennes, France

³ Plateforme Microscopie Electronique MRic/ISFR Biosit/Campus Santé, Univ Rennes, F-35000 Rennes, France

* Correspondence: latifa.bousarghin@univ-rennes1.fr; Tel.: +33-02-23-23-48-98

Abstract: The gut microbiota contributes to human health and disease; however, the mechanisms by which commensal bacteria interact with the host are still unclear. To date, a number of in vitro systems have been designed to investigate the host–microbe interactions. In most of the intestinal models, the enteroendocrine cells, considered as a potential link between gut bacteria and several human diseases, were missing. In the present study, we have generated a new model by adding enteroendocrine cells (ECC) of L-type (NCI-H716) to the one that we have previously described including enterocytes, mucus, and M cells. After 21 days of culture with the other cells, enteroendocrine-differentiated NCI-H716 cells showed neuropods at their basolateral side and expressed their specific genes encoding proglucagon (GCG) and chromogranin A (CHGA). We showed that this model could be stimulated by commensal bacteria playing a key role in health, *Roseburia intestinalis* and *Bacteroides fragilis*, but also by a pathogenic strain such as *Salmonella Heidelberg*. Moreover, using cell-free supernatants of *B. fragilis* and *R. intestinalis*, we have shown that *R. intestinalis* supernatant induced a significant increase in *IL-8* and *PYY* but not in *GCG* gene expression, while *B. fragilis* had no impact. Our data indicated that *R. intestinalis* produced short chain fatty acids (SCFAs) such as butyrate whereas *B. fragilis* produced more propionate. However, these SCFAs were probably not the only metabolites implicated in *PYY* expression since butyrate alone had no effect. In conclusion, our new quadricellular model of gut epithelium could be an effective tool to highlight potential beneficial effects of bacteria or their metabolites, in order to develop new classes of probiotics.

Keywords: hormone-producing cells; quadricellular model; gut commensal bacteria; butyrate; proglucagon; peptide tyrosine tyrosine



Citation: Gautier, T.; Fahet, N.; Tamanai-Shacoori, Z.; Olivier, N.; Blot, M.; Sauvager, A.; Burel, A.; Gall, S.D.-L.; Tomasi, S.; Blat, S.; et al. *Roseburia intestinalis* Modulates PYY Expression in a New a Multicellular Model including Enteroendocrine Cells. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2263. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112263>

Academic Editor: Piotr B. Heczko

Received: 14 October 2022

Accepted: 10 November 2022

Published: 15 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The intestinal microbiota contributes to the human health by maintaining, among others, the intestinal physiology [1]. A number of factors can disturb or alter the intestinal microbiota resulting in intestinal dysbiosis [2,3]. Emerging evidence in both animal and human models suggest that dysbiosis in gut microbiota may contribute to chronic diseases such as obesity and type 2 diabetes (T2D), which have become an increasing public health concern [2,4,5]. Abnormal changes in the gut microbiota cause intestinal epithelial cell damage and destroy the integrity of the intestinal barrier, which drives leakage of bacterial endotoxins and triggers systemic inflammation, thereby disrupting glucose metabolism [6]. However, gut microbiota studies in patients with T2D are limited and inconclusive. Further studies are required to increase the understanding of the complex interplay between intestinal microbiota and the host with T2D. To better understand how internal and external factors affect the commensal bacteria, in vitro models are needed. Most of the intestinal in vitro models are composed of human intestinal cell line Caco-2. However, these models

do not reproduce the diversity of cell types present in the primary tissue, where several cells can be found such as Goblet, Paneth, and enteroendocrine cells. To overcome this limit, tricellular models where CaCo-2 was co-cultured with the mucus producing HT29-MTX cell line and M cells were developed and used to characterize gut bacteria such as *Bacteroides fragilis* [7,8].

The results of various studies showed that *Bacteroides* are decreased in T2D, as *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, and *Roseburia* [9]. *Bacteroides* spp., which constitute up to 30% of colonic microbiota, produce a variety of SCFAs: *B. fragilis* for instance, which is decreased in patients with T2D, produces acetate, butyrate, and mainly propionate [10,11]. *Roseburia* spp. belong to the *Firmicutes* phylum, including most human-gut associated butyrate producers [12,13]. Interest in *Roseburia* spp. has increased with reports showing that the abundance of these bacteria is also reduced in individuals affected by inflammatory diseases and colorectal cancers [13–16]. *R. intestinalis* plays an important role in the maturation of the immune system, primarily through the production of butyrate [13]. Some studies reported that butyrate could both increase and decrease the expression of Interleukin-8 (IL-8), which induces the recruitment of neutrophils to the infection site [17–19]. Intestinal SCFA concentrations are decreased in the presence of pathogenic bacteria such as those from *Enterobacteriaceae* family including *Salmonella* spp., which are often increased in T2D [20].

Increasing evidence suggests that SCFAs may play an important role in the pathogenesis of T2D. SCFAs appear to have a beneficial influence on glucose metabolism by normalizing blood glucose levels. Butyrate has received particular attention for its beneficial effects on both cellular energy metabolism and intestinal homeostasis [17,21,22]. Butyrate and other SCFAs (such as acetate and propionate) are therefore considered as pivotal endogenous signaling molecules, acting through their free fatty-acid receptors (FFAR) 2 and 3 [18]. Within the gut, the expression of these receptors has been localized to EECs, in particular, L-cells (L-ECC) [18]. SCFAs, by binding to L-ECC FFAR2 and FFAR3, can trigger the secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY) [10]. GLP-1 is an incretin hormone known to potentiate insulin secretion by the pancreas [11] and PYY induces satiety [23,24]. GLP-1 derives from proglucagon gene (*GCG*), expressed in both pancreatic cells and L-ECC [25]. Both GLP-1 and PYY can stimulate satiation, inhibiting ingestion, and attenuating glucose hyperglycemia acting either directly on the hypothalamic centers of appetite control, or indirectly via the vagal–brainstem–hypothalamic pathway [26]. Several studies indicated that commensal and pathogenic bacteria modulate gut hormone expression [20,27,28]. *Salmonella* increased hyperglycemia by decreasing GLP-1 secretion and increasing L-ECC apoptosis in *Salmonella*-infected piglets [20]. It was shown that that *Lachnospirillum* spp. and *Butyrivibrio* spp. were positively correlated with an increase of GLP-1 production whereas *Prevotella copri* and *Ruminococcaceae* spp. are associated with insulin resistance [27]. *Lactobacillus* strains can stimulate GLP-1 production both in vitro and in vivo [28]. Altogether, these findings demonstrate the importance the bacterial metabolites SCFAs in the maintenance of metabolic health.

The aim of the current study was to investigate how two key commensal bacteria, *R. intestinalis* and *B. fragilis*, can impact secretion of GLP-1 and PYY in a new in vitro model of intestinal epithelium recapitulating the four main intestinal cell types (enterocytes, goblet cells, M cells, and enteroendocrine cells).

2. Materials and Methods

2.1. Cell Lines and Growth Culture

2.1.1. Endocrine Cells (NCI-H716) Differentiation

Human NCI-H716 cells line, derived from a poorly differentiated adenocarcinoma of human cecum [29], was purchased from ATCC. Cells were maintained and grown in suspension in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 1% of L-glutamine, 1% of 100 UI/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin in a humidified incubator at 37 °C, 5% of CO₂. Cell adhesion and differentiation into endocrine cells were initiated by growing cells for 48 h in 24-well culture plate coated with

Matrigel at 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Corning[®]) [8,30]. Caco-2 cells, HT29-MTX, and RajiB were cultivated as we described in Vernay et al. [8]. To evaluate the differentiation of NCI-H716, cells were stimulated in presence of glucose 1 g/L in phosphate buffer during 24 h.

2.1.2. Cellular Model Composed of Four Cell Types (Quadricellular Model)

Human NCI-H716 cells were added to apical chamber of polycarbonate Transwell[®] inserts containing 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of Matrigel and incubated at 37 °C for 48 h to obtain endocrine differentiated NCI-H716 cells. Upon confluence, Caco-2 and HT29-MTX cells were harvested with trypsin–EDTA and a predetermined number of cells of each type were mixed prior to seeding on this insert containing endocrine differentiated NCI-H716 cells at a ratio of 8:1:1 (Caco-2:HT29-MTX: differentiated NCI-H716). After 14 days of culture, Raji B cells were added to the basolateral chamber to induce the differentiation of Caco-2 cells into M cells [8]. Caco-2/HT29-MTX/endocrine differentiated NCI-H716 cells and Raji B co-culture were maintained for 7 days in DMEM.

2.2. TEER Measurements

The integrity of the polarized epithelial co-culture (Caco-2: HT29-MTX: M: endocrine differentiated NCI-H716 cells) was evaluated as we previously described in Vernay et al. (2020) [8]. For the study of the impact of bacteria cell-free supernatant on the quadricellular model, transwells were transferred into cellZscope cell modules and TEER was measured hourly for 24 h using a cellZscope controller and software as described by [31].

2.3. Transmission Electron Microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was performed on quadricellular model cells after 21 days of growth on polycarbonate Transwell[®] cell culture inserts as described in Vernay et al. (2020) [8]. Briefly, polarized cells were washed with PBS and were fixed for 2 h in room temperature in 2.5% glutaraldehyde dissolved in 0.1 M cacodylate. Samples were postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 h at room temperature, rinsed in cacodylate buffer, and dehydrated in an ascending series of ethanol (70, 90, and 100%). The polycarbonate membrane on which the cells were grown was recovered and cut into thin strips. Samples were then infiltrated with an ascending concentration of Epon resin in ethanol mixtures. Finally, they were placed in fresh Epon for several hours and then embedded in Epon for 48 h at 60 °C. Resin blocks were sectioned into 80 nm ultrathin sections using LEICA UC7 ultramicrotome (LEICA Systems, Vienna, Austria). These sections were mounted on copper grids and stained. Grids were observed using a TEM JEOL-JEM 1400 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 120 kV and equipped with a Gatan Inc. Orius 1000 camera.

2.4. Quantification of Selected Genes Expression Level by Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)

After 21 days of co-culture, RNAs were extracted from the upper chamber. RNAs were extracted using an RNA purification kit, including DNase digestion on-column (MACHEREY-NAGEL), following manufacturer instructions. The purity of the RNAs was determined by analysis A260/A280 ratio using the NanoDrop spectrophotometer. RNAs were transcribed into cDNA with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and following the protocol provided by the manufacturer. The no reverse transcriptase controls were also set up along with sample reactions so as to confirm the absence of genomic DNA contamination. The quantitative RT-PCR amplification of cDNA was performed in a reaction mixture (10 μL) containing SYBR Green master mix and 1 μM primer pairs on a QuantStudio[™] (Applied Biosystems) [32]. The primers used are listed in Table 1. Characteristic genes of each cell type were selected as [8]: sucrase isomaltase (SI), which is specific of Caco-2, mucin-2 (*MUC2*) secreted by HT29-MTX, metalloprotease-15 (*MMP15*) associated to M cells, and proglucagon (*GCG*), chromogranin A (*CHGA*), and peptide YY (*PYY*) for differentiated NCI-H716. Zona occludens-1 (*ZO-1*) and occludin (*OCN*) were also studied to evaluate the presence of cells junctions. Interleukin-8 (*IL-8*)

and transferrin receptor (*TFRC*) were investigated as they can be activated in the presence of bacteria inducing inflammation. Thermal cycling conditions included 95 °C for 15 s, 40 cycles of 95 °C for 3 s, and 60 °C for 1 min. Threshold cycle (*Ct*) values were determined with QuantStudio™ Real-Time qPCR v1.3 software. *Ct* values for each gene were normalized to housekeeping gene *Ct* values: TBP (TATA box binding protein). Fold-change values were calculated after normalization of each gene to the TBP internal control, using the comparative threshold method (Livak and Schmittgen, 2001), with quadracellular model without bacteria or supernatant as the reference condition. Results correspond to relative expression values, reported as the ratio of cells with bacteria/supernatant to cells without bacteria/supernatant.

Table 1. Primers used in this study.

Gene	Encoded Protein	Left Primer	Right Primer
TBP	TATA Box protein	CCGGAATCCCTATCTTTAGTCC	GGGTCAGTCCAGTGCCATAAG
MUC2	Mucin- 2	CAGCACCGATTGCTGACTTG	GCTGGTCATCTCAATGGCAG
SI	Sucrase isomaltase	CATCCTACCATGTCAAGAGCCA	GCTTGTTAAGGTGGTCTGGTTT
MMP15	Metalloprotease 15	ACAACCTATCCCATGCCCATC	ACCTGTCTCTTGAAGAAG
PYY	Peptide Tyrosine-Tyrosine	GCCTTGACCACAGTGCTTC	CTCTTTTCCCATACCGCTGC
GCG	Proglucagon	ACATTGCCAAACGTCACGA	GCGACCTCTTCTGGGAAATC
OCLN	Occludin	CCAATGTGCGAGGAGTGGG	CGCTGCTGTAACGAGGCT
ZO-1	Zonula occludens 1	ATCCCTCAAGGAGCCATTC	CACTTGTTTTGCCAGGTTTAA
IL-8	Interleukin-8	AGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT	TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC
CHGA	Chromogranin-A	CTACGCGCCTTGTCTCCTAC	AGTTGTGCCAGTGGATAGG
TFRC	Transferrine receptor	GCTTCCCCTTTCCTTGCATATCT	GGTGGTACCCAAATAAGGATAATCTGT

2.5. Cytotoxicity Evaluation by Measuring LDH (Lactate Deshydrogenase) Release

Measure of lactate dehydrogenase (LDH) released was performed after incubating the quadracellular model with *S. Heidelberg*, *B. fragilis*, or *R. intestinalis* during 3 h. LDH was evaluated into the culture media using a Cytotoxicity Detection Kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. Results were normalized to a negative control (cells incubated with culture medium DMEM).

2.6. Bacteria Growth Conditions

R. intestinalis DSMZ-14610 was isolated on Columbia agar plates supplemented with 5% (*v/v*) defibrinated horse blood (AES Chemunex, Combourg, France), 25 mg/L of hemin, and 10 mg/L of menadione. *B. fragilis* ATCC 25285 was cultured as we have previously described in Vernay et al. (2020) [8]. The cultures were incubated during 48 h at 37 °C in an anaerobic chamber Macs-VA500 (Don Whitley) flooded with 80% N₂, 10% H₂, and 10% CO₂. Colonies have been added in the Brain Heart Infusion (BHI) medium. In parallel, colonies were then added in complete DMEM medium containing 20% FBS, 1% L-glutamine. The last medium studied is the complete DMEM/BHI medium (1:1, *v/v*), which is an intermediate medium comprising a cell and bacterial culture medium. Following 24 h of incubation in an anaerobic chamber, culture media were collected and CFU enumeration was performed. To separate supernatant and bacterial pellets, the media were centrifuged at 3000 × *g* for 10 min. Supernatant samples were sterilized in 0.22 µm filter and stored at −20 °C.

Fresh *Salmonella* Heidelberg were grown overnight at 37 °C in fresh Luria-Bertani (LB) as previously described in Vernay et al. (2020) [8].

2.7. Determination of Short Chain Fatty Acids (SCFAs) by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS)

SCFA analysis in bacteria supernatants was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). *R. intestinalis* and *B. fragilis* DMEM cultured were thawed and centrifuged at 18,000 g for 10 min. *R. intestinalis* and *B. fragilis* supernatants (100 µL) were combined with 20 µL of a mixture containing 10 µL of acetonitrile (5%) and 10 µL of methanol (80%). Then, 5 µL of 2 mg/mL ethyl-butyric acid (Sigma) used as an internal standard were added. The mixture was centrifuged at 5480 g during 10 min, and 100 µL was filtrated through 0.45-µm filters. A system composed of a 7820A gas chromatograph (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) connected to a mass spectrometry (MS) 5975C detector (Agilent) was used to quantify the SCFAs. Data were collected with MassHunter GC/MS acquisition 10.1 software (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA). Two microliters were directly injected into the gas chromatograph equipped with a ZB-WAX capillary column (30 m length by 0.25 mm internal diameter, with a 0.25 µm film thickness; Agilent) using H₂ as the gas carrier, with a constant flow rate of 1.5 mL/min. The temperature of the injector was kept at 220 °C, and the injection was performed in splitless mode. Chromatographic conditions were as follows: an initial oven temperature of 50 °C, 2 min at 50 °C, 5 °C/min up to 120 °C, 2 min at 120 °C, 5 °C/min up to 180 °C, 5 min at 180 °C, and 5 °C/min up to 220 °C, 5 min at 220 °C. The column was directly connected to the MS detector, and the electron impact energy was set to 70 eV. The MS quadrupole was programmed at 150 °C and MS ion source at 230 °C. The data collected were in the range of 25 to 250 atomic mass units (at 3.18 scans/s). SCFAs were identified by comparing their mass spectra with those held in the NIST Library database (NIST 17 Version 2.3) and by comparing their retention times with those of the corresponding standards (Volatile Free fatty acid mixture CRM46975) purchased from Sigma. Quantification was performed based on relative peak area of each SCFA adjusting the quantity of each compound based on that of the internal standard (IS). The quantity of each compound (µg) was equal to the ratio of relative peak area of each SCFA/relative peak area of IS * quantity of IS (µg).

2.8. Co-Incubation of the Quadricellular Model with Bacteria or Their Cell-Free Supernatant

Before incubation with the quadricellular model, *R. intestinalis* and *B. fragilis* were cultured in complete DMEM medium in anaerobic chamber during 24 h. *S. Heidelberg* was cultured in LB medium followed by incubation for 90 min at 37 °C [33]. This culture was then centrifuged at 3000 × g for 15 min and the pellet was resuspended in complete DMEM, before addition to the apical side of the quadricellular model. In some experiments, after 21 days of coculture, the quadricellular model was incubated with pathogenic bacteria (*S. Heidelberg*) or with commensal bacteria (*B. fragilis* or *R. intestinalis*) at a multiplicity of infection (MOI) of 100, in DMEM without antibiotics. To avoid cell death induced by *S. Heidelberg*, bacteria and quadricellular model were incubated for 3 h only as described in [33], and epithelium integrity (TEER) and cytotoxicity (LDH) were measured. The cells were also lysed for gene expression analysis.

The second experiments were performed by an incubation of the apical side of the multicellular model with *R. intestinalis* or *B. fragilis* cell-free supernatants diluted two-fold in DMEM medium without antibiotics during 24 h, this dilution was used to avoid cell death. The cells were also stimulated by butyrate sodium (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 1.26 mmol/L and propionate sodium (Sigma Aldrich) at 0.20 mmol/L. These concentrations corresponded to the average concentration of SCFAs found in *R. intestinalis* and *B. fragilis* two-fold diluted cell-free supernatant. After 24 h of incubation, cells were lysed to extract RNA for qPCR.

2.9. Statistical Analysis

All experiments were performed in biological and technical triplicates at least. After testing normality of data, distribution was confirmed using the Shapiro–Wilk test. If the distribution of the data was normal, the one-way ANOVA test was used otherwise the

Kruskal–Wallis test was used. Data are presented as mean \pm SEM and p -value less than 0.05 was considered as significant. The analysis of data and generation of the graph were performed by Graph Pad Prism software (Version 8.0).

3. Results

3.1. Differentiated NCI-H716 Cells Expressed Proglucagon (GCG) and Chromogranin A (CHGA) Genes

The NCI-H716 cells were differentiated into endocrine cells for 48 h using Matrigel at $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Differentiated NCI-H716 cells had morphological characteristics different from undifferentiated cells. NCI-H716 cells in vitro grew in suspension as floating aggregates, they were round in shape (Figure 1A). Matrigel-adherent differentiated NCI-H716 cells were filiform with larger cell body volume (Figure 1B). In addition, the differentiated cells had cytoplasmic extensions (black arrows), which may correspond to neuropods (Figure 1B) [32]. In the presence of Matrigel, the number of adherent (coated) cells are higher than untreated NCI-H716 (30.7% and 0.3%, respectively) (Figure 1C).

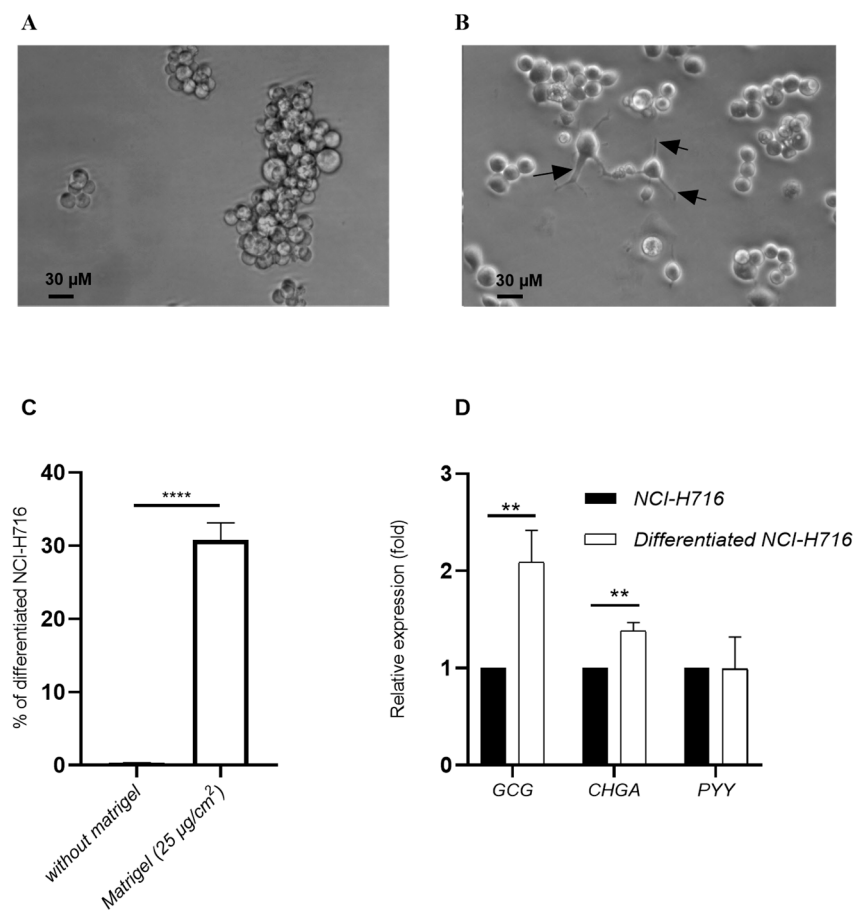


Figure 1. Differentiation of NCI-H716 to endocrine cells: Optical microscopy analysis of morphology of floating NCI-H716 cells (A) or coated endocrine-differentiated NCI-H716 cells with $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of matrigel (B), arrows indicated neuropods. (C) Quantification of coated cells with neuropods after culturing NCI-H716 with matrigel. (D) NCI-H716 and differentiated NCI-H716 were stimulated with 1 g/L of Glucose and GCG, CHGA and PYY genes expression was evaluated. Normality of each condition was checked by Shapiro test and one-way ANOVA (in (D)) or Student test (in (C)) were used. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

The effect of glucose on GCG expression, characteristic of intestinal endocrine L cells, was explored in endocrine-differentiated NCI-H716 cells. Undifferentiated NCI-H716 and differentiated NCI-H716 were stimulated in presence of glucose (1 g/L). A significant increase by 2.1-fold in GCG expression was detected between differentiated and undifferentiated

NCI-H716 (Figure 1D). *CHGA* expression was also significantly increased by 1.4-fold, whereas no variation was observed for *PYY* expression after differentiation (Figure 1D).

3.2. Endocrine-Differentiated NCI-H716 Are Functional in Co-Culture with Caco-2, HT-29 MTX and M Cells

Caco-2, HT29-MTX, and endocrine-differentiated NCI-H716 cells were detected by optical microscopy after 5 or 7 days of coculture (Figure 2A,B, respectively). Endocrine-differentiated NCI-H716 cells established numerous cytoplasmic extensions as shown by black arrows. After 21 days of culture, all the cells were also present as indicated by electron transmission microscopy analysis. Figure 2C showed microvilli at the apical surface of endocrine-differentiated NCI-H716 and visible neuropods (as indicated by arrow) in the basolateral side. Moreover, these cells connected to Caco-2 displayed electron-dense cytoplasm typical of secretion vesicles (Figure 2C).

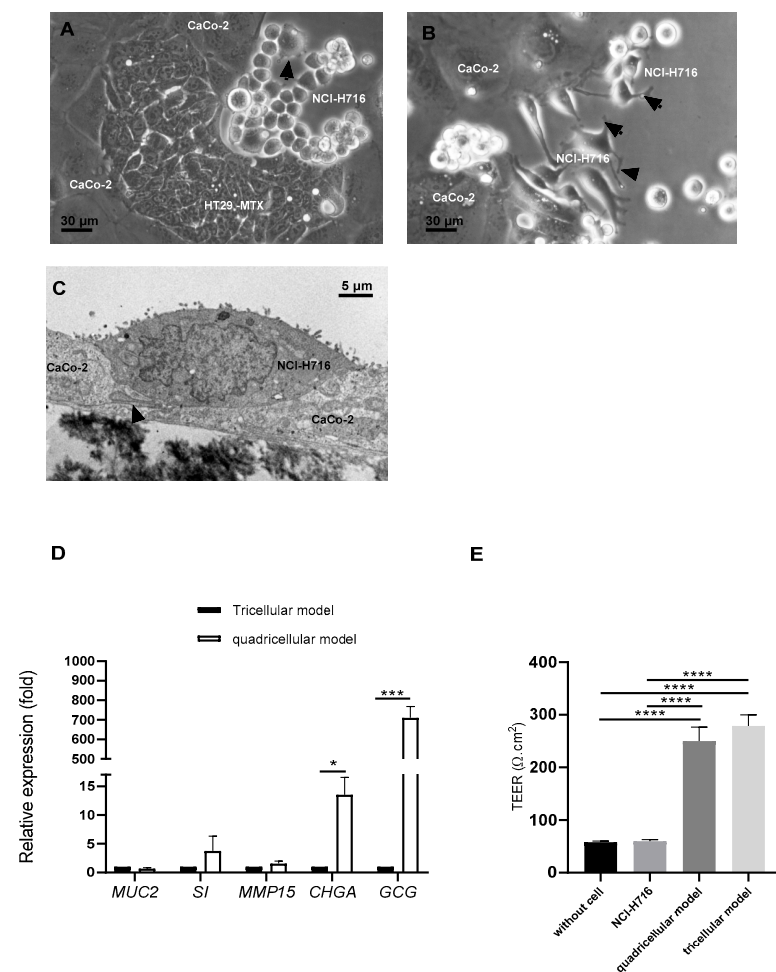


Figure 2. Endocrine-differentiated NCI-H716 in coculture with Caco-2/HT29-MTX and M cells (quadricellular model): Morphology analysis in optical microscopy ((A,B), bars represent 30 μm) or in transmission electron microscopy ((C), bar represents 5 μm), black arrows indicated neuropods, (D) analysis of relative specific genes expression compared to Caco-2/HT29-MTX/ M (tricellular model), and (E) evaluation of TEER at 21 days of culture for quadricellular and tricellular model. Normality of each condition was checked by Shapiro test and one-way ANOVA was used. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

To confirm the presence of all cells after 21 days of culture, we analyzed the expression of genes specific of each cell type (Figure 2D). When compared to their expression in a tricellular model (with only Caco-2, HT29-MTX, and M cells), a significant increase by

710-fold was observed for *GCG* and a 13.53-fold increase for *CHGA*, indicating that in the quadricellular model, endocrine-differentiated NCI-H716 expressed their specific genes. The expression of *MUC2* (HT29-MTX), *SI* (Caco-2), and *MMP15* (M cells) was also detected but the difference was not significant compared to tricellular model (Figure 2D), showing that adding differentiated NCI-H716 did not modify the specificity of other cells.

We have measured the transepithelial electrical resistance (TEER) at 21 days of coculture to investigate epithelium barrier integrity (Figure 2E). When endocrine-differentiated NCI-H716 were cultured alone, TEER value was the same as that on insert without cells indicating that endocrine-differentiated NCI-H716 cells did not establish tight junctions between them. However, when endocrine-differentiated NCI-H716 cells were cocultured with other cells (Caco-2, HT29-MTX, and M cells), TEER was the same as in tricellular model containing only Caco-2, HT29-MTX, and M cells. Their TEER values were significantly higher than endocrine-differentiated NCI-H716 alone, showing that the addition of differentiated NCI-H716 did not affect tight junctions in quadricellular model. The quadricellular model including differentiated NCI-H716 cells was, therefore, well functional.

3.3. The Impact of Commensal and Pathogenic Bacteria on Quadricellular Model

We have investigated if *R. intestinalis* can grow in complete DMEM medium, in which the different cell types used for the quadricellular model were cultured. We compared complete DMEM to BHI, which is a specific bacterial culture medium. Moreover, a mixture of complete DMEM/BHI (1:1, v/v) was studied as an intermediate medium (Figure 3A,B). After 24 h of incubation, *R. intestinalis* showed a significantly greater growth in complete DMEM medium than BHI (an 8.94-fold increase). There was no significant difference in optical density at 600_{nm} (OD 600_{nm}) between complete DMEM/BHI and complete DMEM (Figure 3A). These results were confirmed by enumeration of *R. intestinalis*, which was significantly greater in complete DMEM or in complete DMEM/BHI than in BHI (Figure 3B). Moreover, there was also no difference between complete DMEM and complete DMEM/BHI medium (Figure 3B). However, in order to test the effect of bacteria on quadricellular model, complete DMEM medium (cell culture medium) was used in this study. We have previously showed that *B. fragilis* cultivated in DMEM and can be used to characterize its interaction with intestinal epithelium [8].

Cultures of *R. intestinalis*, *B. fragilis*, or *S. Heidelberg* in complete DMEM were added to apical side of the quadricellular model. The co-culture for 3 h of the quadricellular model of intestinal epithelium with *R. intestinalis*, *B. fragilis*, or *S. Heidelberg* did not induce cell mortality as shown by the level of LDH release by the cells, which was not modified whatever the bacteria compared to the control complete DMEM (Figure 3C). As microbial organisms are known to induce expression of cytokines, we have evaluated the expression of *IL-8*. After 3 h of incubation, quadricellular model in presence of *B. fragilis* showed a significantly decreased by 9.26-fold of *IL-8* expression compared to the incubation with *S. Heidelberg* (Figure 3D). *R. intestinalis* also showed a low *IL-8* level compared to *S. Heidelberg* (a 2.45-fold decrease) infection but higher than *B. fragilis* (a 3.77-fold increase). We have also evaluated the expression of transferrin receptor (*TFRC*) gene, described as activated in presence of inflammatory cytokines [34]. *TFRC* was not significantly modified in presence of these bacteria after 3 h of incubation (Figure 3C). The impact of these bacteria on endocrine function was also evaluated by investigating *GCG* and *CHGA* expression. *B. fragilis* only increased significantly *GCG* expression (a 2.52-fold increase) whereas no significant difference was observed with *CHGA* (Figure 3C).

3.4. *R. intestinalis* and *B. fragilis* Produced SCFAs in DMEM

As each bacterial strain had specific effects without inducing cell death, we investigated if their cell-free supernatants could have an impact.

To determine if *R. intestinalis* and *B. fragilis* growing in complete DMEM produced SCFAs, a GC/MS analysis was conducted to examine the presence of the SCFAs in their supernatant. For *R. intestinalis* supernatant, butyrate (average 2.47 mmol/L) and acetate (average

0.40 mmol/L) were detected after 24 h of culture with a significant difference for butyrate only compared to complete DMEM without bacteria (Figure 4). For *B. fragilis* supernatant, a significant increase can be observed in the concentrations of acetate (1.43 mmol/L) and propionate (0.40 mmol/L) compared to complete DMEM and *B. fragilis* supernatant, whereas butyrate (0.99 mmol/L) was significantly increased compared to complete DMEM but significantly less than in *R. intestinalis* supernatant.

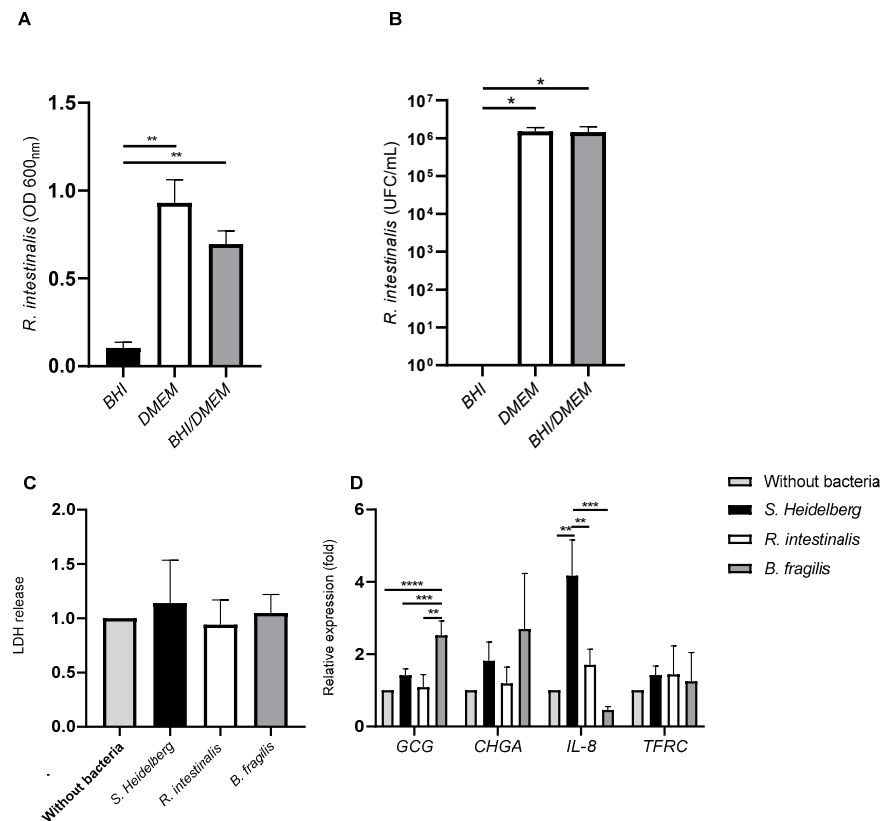


Figure 3. Impact of beneficial bacteria (*Roseburia intestinalis* and *Bacteroides fragilis*) and pathogenic bacteria (*S. Heidelberg*) on quadricellular model. (A,B) *R. intestinalis* and *B. fragilis* growth characterization, (A) overnight culture in BHI, or in DMEM media and in a medium containing a mixture of BHI and DMEM (1:1, v/v); (B) Enumeration of overnight culture in the same media. (C) LDH release after 3 h of incubation of bacteria with the quadricellular model. The results were normalized to cells without bacteria. (D) Analyze of genes expression implicated in endocrine (*GCG* and *CHGA*), in immune (*IL-8*) functions and transferrin receptor (*TFRC*) after 3 h of incubation. Normality of each condition was checked by Shapiro test and one-way ANOVA was used. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; and **** $p < 0.0001$.

R. intestinalis and *B. fragilis* supernatants were tested in the quadricellular model to determine if the effects observed with the bacteria could be imitated by the supernatants. The butyrate and synthetic propionate conditions were added to investigate if the mediated effects by supernatants could be related to SCFAs. In the presence of *R. intestinalis* supernatant, an increase of *PYY* and *IL-8* genes expression was significantly different compared to untreated cells (Figure 5A). However, for *GCG*, *SI*, and *MUC2* expression, no significant difference was observed. Moreover, contrary to *R. intestinalis*, *B. fragilis* supernatant did not significantly induce the expression *PYY* (an 8.8-fold increase) or *IL-8* (a 118.4-fold increase). Moreover, contrary to the *R. intestinalis* supernatant, synthetic butyrate (at the same concentrations as in the two-fold diluted *R. intestinalis* supernatant) did not significantly increase *PYY* secretion. For other genes implicated in tight junctions such as *OCLD* and *ZO-1*, a significant decrease was observed compared to untreated cells with *R. intestinalis* supernatant (0.73 ± 0.25 and 0.69 ± 0.16 -fold, respectively). However, this decrease did not seem to modify TEER as Cellzscope analysis showed that *R. intestinalis* supernatant significantly improved TEER (Figure 5B). After 13 h

of incubation with *R. intestinalis* supernatant, the increase of TEER is improved by two-fold compared to the untreated cells and the difference was significant whereas in the presence of *B. fragilis* supernatant, TEER was also increased but not significantly.

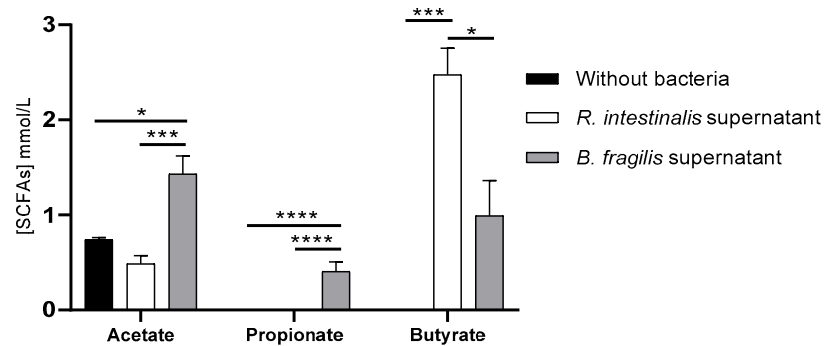


Figure 4. *R. intestinalis* and *B. fragilis* SCFAs production in complete DMEM: quantification of short fatty acids (acetate, propionate, and butyrate) in complete DMEM by GC-MS (mmol/L). Normality of each condition was checked by Shapiro test and one-way ANOVA was used. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

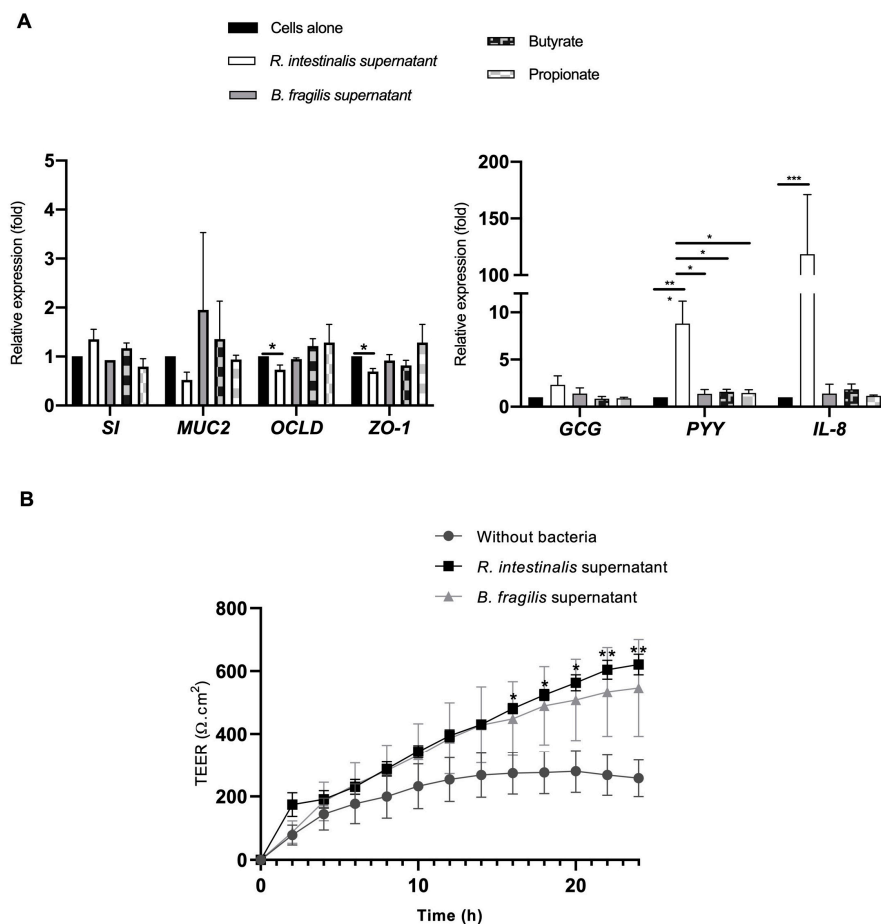


Figure 5. Stimulation of the quadricellular model with *R. intestinalis* or *B. fragilis* supernatants; with butyrate sodium (1.26 mmol/L) or propionate sodium (0.20 mmol/L): (A) Relative expression of specific genes implicated in barrier function (*SI*, *MUC2*, *OCLD*, and *ZO-1*), in endocrine function (*GCG* and *PYY*) and in immune response (*IL-8*) after 24 h of incubation; (B) impact on the TEER during 24 h for *R. intestinalis* and *B. fragilis* cell-free supernatant. Normality of each condition was checked by Shapiro test and Kruskal–Wallis test was used * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Emerging evidence suggests that dysbiosis in gut microbiota may contribute to diabetes; however, gut microbiota studies in patients with T2D are limited and inconclusive. To better understand how internal and external factors affect the commensal bacteria and their interaction with host, we have generated for the first time a quadricellular model including enteroendocrine cells (NCI-H716). At first, we have plated NCI-H716 to differentiate them into an endocrine lineage [35]. Several studies have indicated that this strategy does not alter levels of GLP-1 in these cells [36,37]. In our study, NCI-H716 became adherent endocrine-differentiated cells and expressed *GCG* in the presence of glucose but not *PYY* as shown by Kuhre et al. (2016) [38]. As endocrine cells comprise accounts for only 1% of the intestinal epithelium [39], and to be similar to human intestinal barrier, we have added L cells (NCI-H716) to the main other cells such as enterocytes (Caco-2), mucus cells (HT29-MTX) and M cells [8]. Ref. [40] suggested that the co-culture of Caco-2 and NCI-H716 may be more suitable for the study of glucose transport than the Caco-2 model. Indeed, glucose transport was faster in coculture of Caco-2/NCI-H716 than monoculture of Caco-2 [40]. Moreover, in vivo, L cells are integrated within the epithelial cell layer and are therefore differentially exposed to luminal and plasma constituents at their apical and basolateral membrane surfaces [41]. We have addressed this limit by culturing the four cell types on insert transwell to have basal and apical side. After 21 days of culture with other cells, endocrine-differentiated NCI-H716 expressed their specific genes as *GCG* and *CHGA* (Figure 2D). Moreover, the presence of the endocrine-differentiated NCI-H716 did not change the function Caco-2 and HT29-MTX cells as their specific gene expression can be detected (Figure 2E).

This quadricellular model can be stimulated by commensal and pathogenic bacteria (Figure 3D). As the key role of two bacteria, *R. intestinalis* and *Bacteroides*, found in lower frequency in T2D, has not been fully described, we have analyzed their impact on the endocrine function. It was described that gut microbiota in T2D modified gut hormone secretion [18]. T2D being characterized by an expansion of facultative anaerobic *Enterobacteriaceae*, we used *S. Heidelberg* as pathogenic bacteria in this study [42]. We have shown that in the presence of bacteria, the expression of *IL-8* was more important for *S. Heidelberg* than *R. intestinalis* or *B. fragilis* (Figure 3D). It is well known that *Salmonella* activated *IL-8* by its flagellin recognition by TLR5 [43,44]. Moreover, *R. intestinalis*-derived flagellin has been proved as an effective modulator of inflammatory gut responses [45]. *B. fragilis* was described as promoting mucosal immune development and reduced inflammation [46–48]. For endocrine function, we also have a difference between the three bacteria. Only *B. fragilis* showed a significant increase of *GCG* expression compared to *S. Heidelberg* and *R. intestinalis* (Figure 3D). These results were not surprising as it was described by [49] that *Bacteroides* regulate bile acid metabolism by converting taurochenodeoxycholic acid to lithocholic acid, which activates G protein-coupled bile acid receptor-1 (TGR5) to stimulate GLP-1 secretion from L cells [49]. *B. fragilis* that we used in this study produced bile acids after growing in cell culture medium containing fetal bovine serum [50,51]. Interestingly, it was also reported that C57BL/6 mice reconstituted with *Bacteroides acidifaciens* had increased GLP-1 [52]. As *R. intestinalis* and *B. fragilis* had beneficial effects, we have tested their cell-free supernatant on the quadricellular model. We have evaluated the impact of these supernatants on the integrity of the epithelium by analyzing the expression of two genes, *ZO-1* and *OCLD*, implicated in cell junctions which constitute the epithelium barrier. *R. intestinalis* supernatant significantly decreased the expression of *ZO-1* and *OCLD*, but at low level which did not disturb TEER measurement (Figure 5A,B). Indeed, in the presence of *R. intestinalis*, TEER increased by two-fold after an incubation of 13 h. Moreover, even *R. intestinalis* supernatant induced *IL-8* expression compared to control and compared to *B. fragilis* supernatant, which did not activate *IL-8* expression. Decrease of *ZO-1* and *OCLD* in the presence of *R. intestinalis* can be correlated to the increase of *IL-8* expression [53]. We can speculate when *Roseburia* and *Bacteroides* are decreased, their beneficial effects are also decreased, which can explain that in T2D there is significantly enhanced permeability in the gut resulting in inflammation.

Moreover, we identified that *R. intestinalis* supernatant induced a significant increase in PYY but not GCG (Figure 5A), while *B. fragilis* appeared to have no impact. We have identified that these two bacteria are different in their capacity in secreting SCFAs (Figure 4). Indeed, in our conditions, *R. intestinalis* produced more butyrate whereas *B. fragilis* secreted more propionate and acetate. These results agree with other studies describing *B. fragilis* and *R. intestinalis* SCFAs [13,21,22,54,55]. However, when this quadricellular model was stimulated with synthetic butyrate sodium and propionate sodium at the same concentration as in the diluted supernatant, PYY expression was not significantly different from the control (Figure 5A). Several studies in isolated cell cultures suggested that SCFAs are direct enhancers of GLP-1 and PYY secretion [56], and a few human studies find increased GLP-1 and/or PYY secretion in response to rectally administered SCFAs [56,57]. Some studies showed that luminal and especially vascular infusion of acetate and butyrate significantly increases colonic GLP-1 secretion, and to a minor extent also PYY secretion. Propionate neither affected GLP-1 nor PYY secretion whether administered luminally or vascularly [57]. The difference between all these studies can be explained presumably because the majority of these SCFAs either remain in the colonic lumen or are absorbed and metabolized by the colonocytes [57]. In our study, butyrate sodium and propionate sodium did not induce a significant increase; these molecules are probably absorbed by Caco-2 and HT29-MTX. Moreover, the concentration of butyrate produced by *R. intestinalis* in vitro is lower (1.26 mmol/L) than in human where the total concentrations of SCFAs is approximately 20 to 40 mmol/L in ileum (Acetate/Propionate/Butyrate ratio 3:1:1) (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00277/full#T2>, accessed on 13 October 2022). We can speculate that other molecules produced by *R. intestinalis* probably activate PYY secretion. Indeed, it was shown also that PYY secretion can be modulated by LPS, flagelin, and CpG, which have been shown to increase CCK secretion in STC-1 cells in in vivo models [58]. Moreover, by analyzing the metabolic products of the gut microbiota and their effects on host metabolism, SCFAs, branched-chain amino acids, bile acids signaling, and gut permeability might be remarkably linked to initiation and aggravation of T2D [59,60]. Other studies have shown that a low level of PYY was found in obese patients where *Roseburia* was found to be decreased [21,61]. Administration of *R. intestinalis* could restore the circulating PYY level, induce satiety, and cause a decrease in food intake. One study showed that bacterial proteins have been linked to satiety signaling such as *Escherichia coli* caseinolytic protease B (ClpB) stimulating the secretion of PYY in primary cell cultures of rat intestinal mucosa at nanomolar concentrations [62]. However, new studies are needed to better understand the specific molecular mechanisms that mediate the beneficial effect of *Roseburia intestinalis*.

5. Conclusions

To conclude, we have demonstrated in this study that enteroendocrine cells can be incorporated to cells mimicking enterocytes (Caco-2), mucus cells (HT29-MTX), and M cells without modifying their functions. The quadricellular model described here provides an in vitro system that could be a good alternative to further explore the roles of gut microbiota in T2D, by identifying which microbes are important and how they contribute to crosstalk. Due to the potential effects of GLP-1 and PYY, selecting bacteria inducing the secretion of these two molecules can be considered as the key to the development of these new classes of therapeutics. However, our study has limitations as only one strain was used, and we did not consider the bacterial diversity found in gut microbiota. More investigations are needed with a diverse and complex microbial community, playing a central role in human health.

Author Contributions: Conceptualization, S.T. and L.B.; Formal analysis, T.G., S.T. and L.B.; Funding acquisition, L.B.; Investigation, T.G., N.F., S.D.-L.G., S.T., S.B. and L.B.; Methodology, T.G., N.F., Z.T.-S., N.O., M.B., A.S. and A.B.; Project administration, L.B.; Supervision, L.B.; Validation, L.B.; Visualization, L.B.; Writing—original draft, T.G. and L.B.; Writing—review & editing, Z.T.-S., S.D.-L.G., S.T., S.B. and L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the INSERM, France.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank Alexis Février, Laura Leprevost, Mathis Brochard, Louise Philidet, and Anne Billeret for their help in this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- de Vos, W.M.; Tilg, H.; Van Hul, M.; Cani, P.D. Gut Microbiome and Health: Mechanistic Insights. *Gut* **2022**, *71*, 1020–1032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sohail, M.U.; Althani, A.; Anwar, H.; Rizzi, R.; Marei, H.E. Role of the Gastrointestinal Tract Microbiome in the Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 9631435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Esser, N.; Legrand-Poels, S.; Piette, J.; Scheen, A.J.; Paquot, N. Inflammation as a Link between Obesity, Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2014**, *105*, 141–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kashtanova, D.A.; Tkacheva, O.N.; Doudinskaya, E.N.; Strazhesko, I.D.; Kotovskaya, Y.V.; Popenko, A.S.; Tyakht, A.V.; Alexeev, D.G. Gut Microbiota in Patients with Different Metabolic Statuses: Moscow Study. *Microorganisms* **2018**, *6*, 98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Takagi, T.; Naito, Y.; Kashiwagi, S.; Uchiyama, K.; Mizushima, K.; Kamada, K.; Ishikawa, T.; Inoue, R.; Okuda, K.; Tsujimoto, Y.; et al. Changes in the Gut Microbiota Are Associated with Hypertension, Hyperlipidemia, and Type 2 Diabetes Mellitus in Japanese Subjects. *Nutrients* **2020**, *12*, 2996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, X.; Watanabe, K.; Kimura, I. Gut Microbiota Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1882. [[CrossRef](#)]
- Schimpel, C.; Teubl, B.; Absenger, M.; Meindl, C.; Fröhlich, E.; Leitinger, G.; Zimmer, A.; Roblegg, E. Development of an Advanced Intestinal In Vitro Triple Culture Permeability Model to Study Transport of Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 808–818. [[CrossRef](#)]
- Vernay, T.; Cannie, I.; Gaboriau, F.; Gall, S.D.-L.; Tamanai-Shacoori, Z.; Burel, A.; Jolivet-Gougeon, A.; Loréal, O.; Bousarghin, L. Bacteroides Fragilis Prevents Salmonella Heidelberg Translocation in Co-Culture Model Mimicking Intestinal Epithelium. *Benef. Microbes* **2020**, *11*, 391–401. [[CrossRef](#)]
- Gurung, M.; Li, Z.; You, H.; Rodrigues, R.; Jump, D.B.; Morgun, A.; Shulzhenko, N. Role of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes Pathophysiology. *eBioMedicine* **2020**, *51*, 102590. [[CrossRef](#)]
- Zhao, L.; Zhang, F.; Ding, X.; Wu, G.; Lam, Y.Y.; Wang, X.; Fu, H.; Xue, X.; Lu, C.; Ma, J.; et al. Gut Bacteria Selectively Promoted by Dietary Fibers Alleviate Type 2 Diabetes. *Science* **2018**, *359*, 1151–1156. [[CrossRef](#)]
- Larraufie, P.; Roberts, G.P.; McGavigan, A.K.; Kay, R.G.; Li, J.; Leiter, A.; Melvin, A.; Biggs, E.K.; Ravn, P.; Davy, K.; et al. Important Role of the GLP-1 Axis for Glucose Homeostasis after Bariatric Surgery. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 1399–1408.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Duncan, S.H.; Hold, G.L.; Barcenilla, A.; Stewart, C.S.; Flint, H.J. *Roseburia Intestinalis* Sp. Nov., a Novel Saccharolytic, Butyrate-Producing Bacterium from Human Faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2002**, *52*, 1615–1620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Xu, F.; Cheng, Y.; Ruan, G.; Fan, L.; Tian, Y.; Xiao, Z.; Chen, D.; Wei, Y. New Pathway Ameliorating Ulcerative Colitis: Focus on *Roseburia Intestinalis* and the Gut–Brain Axis. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2021**, *14*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bickel, M. The Role of Interleukin-8 in Inflammation and Mechanisms of Regulation. *J. Periodontol.* **1993**, *64*, 456–460.
- Huang, N.; Katz, J.P.; Martin, D.R.; Wu, G.D. Inhibition of IL-8 Gene Expression in Caco-2 Cells by Compounds Which Induce Histone Hyperacetylation. *Cytokine* **1997**, *9*, 27–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fusunyan, R.D.; Quinn, J.J.; Fujimoto, M.; MacDermott, R.P.; Sanderson, I.R. Butyrate Switches the Pattern of Chemokine Secretion by Intestinal Epithelial Cells through Histone Acetylation. *Mol. Med.* **1999**, *5*, 631–640. [[CrossRef](#)]
- Gautier, T.; David-Le Gall, S.; Sweidan, A.; Tamanai-Shacoori, Z.; Jolivet-Gougeon, A.; Loréal, O.; Bousarghin, L. Next-Generation Probiotics and Their Metabolites in COVID-19. *Microorganisms* **2021**, *9*, 941. [[CrossRef](#)]
- Kasubuchi, M.; Hasegawa, S.; Hiramatsu, T.; Ichimura, A.; Kimura, I. Dietary Gut Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, and Host Metabolic Regulation. *Nutrients* **2015**, *7*, 2839–2849. [[CrossRef](#)]
- Pingitore, A.; Chambers, E.S.; Hill, T.; Maldonado, I.R.; Liu, B.; Bewick, G.; Morrison, D.J.; Preston, T.; Wallis, G.A.; Tedford, C.; et al. The Diet-Derived Short Chain Fatty Acid Propionate Improves Beta-Cell Function in Humans and Stimulates Insulin Secretion from Human Islets in Vitro. *Diabetes Obes. Metab.* **2017**, *19*, 257–265. [[CrossRef](#)]
- Zong, Y.; Chen, W.; Zhao, Y.; Suo, X.; Yang, X. Salmonella Infection Causes Hyperglycemia for Decreased GLP-1 Content by Enteroendocrine L Cells Pyroptosis in Pigs. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1272. [[CrossRef](#)]
- Tamanai-Shacoori, Z.; Smida, I.; Bousarghin, L.; Loreal, O.; Meuric, V.; Fong, S.B.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A. *Roseburia* Spp.: A Marker of Health? *Future Microbiol.* **2017**, *12*, 157–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhu, C.; Song, K.; Shen, Z.; Quan, Y.; Tan, B.; Luo, W.; Wu, S.; Tang, K.; Yang, Z.; Wang, X. *Roseburia Intestinalis* Inhibits Interleukin-17 Excretion and Promotes Regulatory T Cells Differentiation in Colitis. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 7567–7574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sun, Y.; Duarte, M.E.; Kim, S.W. Dietary Inclusion of Multispecies Probiotics to Reduce the Severity of Post-Weaning Diarrhea Caused by *Escherichia Coli* F18+ in Pigs. *Anim. Nutr.* **2021**, *7*, 326–333. [[CrossRef](#)]

24. Tan, T.; Behary, P.; Tharakan, G.; Minnion, J.; Al-Najim, W.; Albrechtsen, N.J.W.; Holst, J.J.; Bloom, S.R. The Effect of a Subcutaneous Infusion of GLP-1, OXM, and PYY on Energy Intake and Expenditure in Obese Volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2017**, *102*, 2364–2372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Müller, T.D.; Finan, B.; Bloom, S.R.; D'Alessio, D.; Drucker, D.J.; Flatt, P.R.; Fritsche, A.; Gribble, F.; Grill, H.J.; Habener, J.F.; et al. Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1). *Mol. Metab.* **2019**, *30*, 72–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Svane, M.S.; Jørgensen, N.B.; Bojsen-Møller, K.N.; Dirksen, C.; Nielsen, S.; Kristiansen, V.B.; Toräng, S.; Wewer Albrechtsen, N.J.; Rehfeld, J.F.; Hartmann, B.; et al. Peptide YY and Glucagon-like Peptide-1 Contribute to Decreased Food Intake after Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery. *Int. J. Obes.* **2016**, *40*, 1699–1706. [[CrossRef](#)]
27. Tsai, C.-Y.; Lu, H.-C.; Chou, Y.-H.; Liu, P.-Y.; Chen, H.-Y.; Huang, M.-C.; Lin, C.-H.; Tsai, C.-N. Gut Microbial Signatures for Glycemic Responses of GLP-1 Receptor Agonists in Type 2 Diabetic Patients: A Pilot Study. *Front. Endocrinol.* **2022**, *12*, 814770. [[CrossRef](#)]
28. Panwar, H.; Calderwood, D.; Gillespie, A.L.; Wylie, A.R.; Graham, S.F.; Grant, I.R.; Grover, S.; Green, B.D. Identification of Lactic Acid Bacteria Strains Modulating Incretin Hormone Secretion and Gene Expression in Enteroendocrine Cells. *J. Funct. Foods* **2016**, *23*, 348–358. [[CrossRef](#)]
29. Park, J.G.; Oie, H.K.; Sugarbaker, P.H.; Henslee, J.G.; Chen, T.R.; Johnson, B.E.; Gazdar, A. Characteristics of Cell Lines Established from Human Colorectal Carcinoma. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 6710–6718.
30. Le Bars, H.; Le Gall-David, S.; Renoux, V.M.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A.; Bousarghin, L. Impact of a Mutator Phenotype on Motility and Cell Adherence in Salmonella Heidelberg. *Vet. Microbiol.* **2012**, *159*, 99–106. [[CrossRef](#)]
31. Anderson, R.C.; MacGibbon, A.K.H.; Haggarty, N.; Armstrong, K.M.; Roy, N.C. Bovine Dairy Complex Lipids Improve in Vitro Measures of Small Intestinal Epithelial Barrier Integrity. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bohórquez, D.V.; Chandra, R.; Samsa, L.A.; Vigna, S.R.; Liddle, R.A. Characterization of Basal Pseudopod-like Processes in Ileal and Colonic PYY Cells. *J. Mol. Histol.* **2011**, *42*, 3–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gall-David, S.L.; Zenbaa, N.; Bouchard, D.; Lavault, M.-T.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A.; Bousarghin, L. Hypermutator Salmonella Heidelberg Induces an Early Cell Death in Epithelial Cells. *Vet. Microbiol.* **2015**, *180*, 65–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Harel, E.; Rubinstein, A.; Nissan, A.; Khazanov, E.; Milbauer, M.N.; Barenholz, Y.; Tirosh, B. Enhanced Transferrin Receptor Expression by Proinflammatory Cytokines in Enterocytes as a Means for Local Delivery of Drugs to Inflamed Gut Mucosa. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24202. [[CrossRef](#)]
35. Reimer, R.A.; Darimont, C.; Gremlich, S.; Nicolas-Métral, V.; Rüegg, U.T.; Macé, K. A Human Cellular Model for Studying the Regulation of Glucagon-like Peptide-1 Secretion. *Endocrinology* **2001**, *142*, 4522–4528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Anini, Y.; Brubaker, P.L. Role of Leptin in the Regulation of Glucagon-like Peptide-1 Secretion. *Diabetes* **2003**, *52*, 252–259. [[CrossRef](#)]
37. During, M.J.; Cao, L.; Zuzga, D.S.; Francis, J.S.; Fitzsimons, H.L.; Jiao, X.; Bland, R.J.; Klugmann, M.; Banks, W.A.; Drucker, D.J.; et al. Glucagon-like Peptide-1 Receptor Is Involved in Learning and Neuroprotection. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1173–1179. [[CrossRef](#)]
38. Kuhre, R.E.; Albrechtsen, N.J.W.; Deacon, C.F.; Balk-Møller, E.; Rehfeld, J.F.; Reimann, F.; Gribble, F.M.; Holst, J.J. Peptide Production and Secretion in GLUTag, NCI-H716 and STC-1 Cells: A Comparison to Native L-Cells. *J. Mol. Endocrinol.* **2016**, *56*, 201–211. [[CrossRef](#)]
39. Sjölund, K.; Sandén, G.; Håkanson, R.; Sundler, F. Endocrine Cells in Human Intestine: An Immunocytochemical Study. *Gastroenterology* **1983**, *85*, 1120–1130. [[CrossRef](#)]
40. Xie, N.; Huang, X.; Yang, C.; Dai, M.; Cai, L.; Deng, S.; Hardiman, P.J.; Zhou, J. Artificial Sweeteners Affect the Glucose Transport Rate in the Caco-2/NCI-H716 Co-Culture Model. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 4887–4892. [[CrossRef](#)]
41. Tolhurst, G.; Reimann, F.; Gribble, F.M. Nutritional Regulation of Glucagon-like Peptide-1 Secretion. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 27–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Shin, N.-R.; Whon, T.W.; Bae, J.-W. Proteobacteria: Microbial Signature of Dysbiosis in Gut Microbiota. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 496–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ménard, S.; Lacroix-Lamandé, S.; Ehrhardt, K.; Yan, J.; Grassl, G.A.; Wiedemann, A. Cross-Talk Between the Intestinal Epithelium and Salmonella Typhimurium. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 906238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Huang, F.-C. Regulation of Salmonella Flagellin-Induced Interleukin-8 in Intestinal Epithelial Cells by Muramyl Dipeptide. *Cell. Immunol.* **2012**, *278*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Quan, Y.; Song, K.; Zhang, Y.; Zhu, C.; Shen, Z.; Wu, S.; Luo, W.; Tan, B.; Yang, Z.; Wang, X. Roseburia Intestinalis-Derived Flagellin Is a Negative Regulator of Intestinal Inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *501*, 791–799. [[CrossRef](#)]
46. Chen, L.; Yang, M.; Zhu, W.; Su, Y.; Li, D.; Wang, T. Multi-Omics Analysis After Vaginal Administration of Bacteroides Fragilis in Chickens. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 846011. [[CrossRef](#)]
47. Chan, J.L.; Wu, S.; Geis, A.L.; Chan, G.V.; Gomes, T.A.M.; Beck, S.E.; Wu, X.; Fan, H.; Tam, A.J.; Chung, L.; et al. Non-Toxicogenic Bacteroides Fragilis (NTBF) Administration Reduces Bacteria-Driven Chronic Colitis and Tumor Development Independent of Polysaccharide A. *Mucosal Immunol.* **2019**, *12*, 164–177. [[CrossRef](#)]
48. Qu, D.; Sun, F.; Feng, S.; Yu, L.; Tian, F.; Zhang, H.; Chen, W.; Zhai, Q. Protective Effects of Bacteroides Fragilis against Lipopolysaccharide-Induced Systemic Inflammation and Their Potential Functional Genes. *Food Funct.* **2022**, *13*, 1015–1025. [[CrossRef](#)]

49. Pathak, P.; Xie, C.; Nichols, R.G.; Ferrell, J.M.; Boehme, S.; Krausz, K.W.; Patterson, A.D.; Gonzalez, F.J.; Chiang, J.Y.L. Intestine Farnesoid X Receptor Agonist and the Gut Microbiota Activate G-Protein Bile Acid Receptor-1 Signaling to Improve Metabolism. *Hepatology* **2018**, *68*, 1574–1588. [[CrossRef](#)]
50. Princen, H.M.; Meijer, P. Maintenance of Bile Acid Synthesis and Cholesterol 7 Alpha-Hydroxylase Activity in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochem. J.* **1990**, *272*, 273–275. [[CrossRef](#)]
51. Gautier, T.; Olivieiro, N.; Ferron, S.; Le Pogam, P.; David-Le Gall, S.; Sauvager, A.; Leroyer, P.; Cannie, I.; Dion, S.; Sweidan, A.; et al. Bacteroides fragilis derived metabolites, identified by molecular networking, decrease Salmonella virulence in mice model. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1023315. [[CrossRef](#)]
52. Yang, J.-Y.; Lee, Y.-S.; Kim, Y.; Lee, S.-H.; Ryu, S.; Fukuda, S.; Hase, K.; Yang, C.-S.; Lim, H.S.; Kim, M.-S.; et al. Gut Commensal Bacteroides Acidifaciens Prevents Obesity and Improves Insulin Sensitivity in Mice. *Mucosal Immunol.* **2017**, *10*, 104–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Yu, H.; Huang, X.; Ma, Y.; Gao, M.; Wang, O.; Gao, T.; Shen, Y.; Liu, X. Interleukin-8 Regulates Endothelial Permeability by down-Regulation of Tight Junction but Not Dependent on Integrins Induced Focal Adhesions. *Int. J. Biol. Sci.* **2013**, *9*, 966–979. [[CrossRef](#)]
54. Kasahara, K.; Krautkramer, K.A.; Org, E.; Romano, K.A.; Kerby, R.L.; Vivas, E.I.; Mehrabian, M.; Denu, J.M.; Bäckhed, F.; Lusi, A.J.; et al. Interactions between Roseburia Intestinalis and Diet Modulate Atherogenesis in a Murine Model. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 1461–1471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Navab-Moghadam, F.; Sedighi, M.; Khamseh, M.E.; Alaei-Shahmiri, F.; Talebi, M.; Razavi, S.; Amirmozafari, N. The Association of Type II Diabetes with Gut Microbiota Composition. *Microb. Pathog.* **2017**, *110*, 630–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Canfora, E.E.; van der Beek, C.M.; Jocken, J.W.E.; Goossens, G.H.; Holst, J.J.; Olde Damink, S.W.M.; Lenaerts, K.; Dejong, C.H.C.; Blaak, E.E. Colonic Infusions of Short-Chain Fatty Acid Mixtures Promote Energy Metabolism in Overweight/Obese Men: A Randomized Crossover Trial. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2360. [[CrossRef](#)]
57. Christiansen, C.B.; Gabe, M.B.N.; Svendsen, B.; Dragsted, L.O.; Rosenkilde, M.M.; Holst, J.J. The Impact of Short-Chain Fatty Acids on GLP-1 and PYY Secretion from the Isolated Perfused Rat Colon. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2018**, *315*, G53–G65. [[CrossRef](#)]
58. Covasa, M.; Stephens, R.W.; Todorean, R.; Cobuz, C. Intestinal Sensing by Gut Microbiota: Targeting Gut Peptides. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 82. [[CrossRef](#)]
59. Pizarroso, N.A.; Fuciños, P.; Gonçalves, C.; Pastrana, L.; Amado, I.R. A Review on the Role of Food-Derived Bioactive Molecules and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Satiety Regulation. *Nutrients* **2021**, *13*, 632. [[CrossRef](#)]
60. Xia, F.; Wen, L.-P.; Ge, B.-C.; Li, Y.-X.; Li, F.-P.; Zhou, B.-J. Gut Microbiota as a Target for Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes: Mechanisms and Dietary Natural Products. *World J. Diabetes* **2021**, *12*, 1146–1163. [[CrossRef](#)]
61. Karra, E.; Chandarana, K.; Batterham, R.L. The Role of Peptide YY in Appetite Regulation and Obesity. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 19–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Dominique, M.; Lucas, N.; Legrand, R.; Bouleté, I.-M.; Bôle-Feysot, C.; Deroissart, C.; Léon, F.; Nobis, S.; do Rego, J.-C.; Lambert, G.; et al. Effects of Bacterial CLPB Protein Fragments on Food Intake and PYY Secretion. *Nutrients* **2021**, *13*, 2223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

V) Discussion générale et perspective

L'identification d'un grand nombre de bactéries commensales de l'intestin a été accélérée grâce au séquençage à haut débit (136). Les études des variations du microbiote intestinal ont permis de mettre en évidence que certaines bactéries sont augmentées, tandis que d'autres sont diminuées dans les pathologies intestinales, telles que les MICI, le CRC, l'obésité et le DT2 (tableau 1). Cette variation des espèces du microbiote intestinal pourrait être un biomarqueur de ces pathologies. Certaines bactéries augmentées entraînent une pathogénicité. Les bactéries commensales diminuées, tel que les PNGs, confèrent de nombreux effets bénéfiques. Les entérobactéries pathogènes comme *Salmonella* sont augmentées (144,145,158,161,175) alors que les potentiels PNGs *Bacteroides fragilis* (171,195,304,305), *Roseburia intestinalis* (172,173,186,194,195), *Akkermansia muciniphila* (176,191–193,195) et *Faecalibacterium prausnitzii* (168,173,186,195,197,306,307) sont diminuées dans les pathologies intestinales chroniques. Il a également été montré que les PNGs produisent des métabolites qui sont capables de rejoindre la circulation sanguine pour exercer des effets bénéfiques sur d'autres organes comme les poumons ou le cerveau (figure 21).

La première partie du travail de thèse a permis de mettre en avant les effets des PNGs, sur l'homéostasie intestinale et les impacts bénéfiques de leurs métabolites sur l'homéostasie pulmonaire. L'administration des PNGs, comme traitement alternatif, contre les infections virales du tractus respiratoire a alors été analysée (revue). Pour étudier les mécanismes qui lient les bactéries commensales diminuées et celles qui sont augmentées dans les pathologies intestinales, nous avons étudié l'interaction entre *B. fragilis* NTCC 9343 et *S. Heidelberg* B182. Une étude menée au sein du laboratoire a montré que *B. fragilis* limitait la virulence de *S. Heidelberg* *in vitro* et *in vivo*. Cette

inhibition du phénomène de translocation de *S. Heidelberg* pourrait être liée à la sécrétion d'un (des) métabolite(s) produit(s) par *B. fragilis* appelé acide cholique (CA). CA a été identifié comme responsable de l'inhibition de la translocation de *S. Heidelberg*. Il était retrouvé dans le surnageant et les fractions actives de *B. fragilis* et est capable d'inhiber la translocation de *S. Heidelberg* en diminuant l'expression du gène de virulence *sipA* (371). Cette étude montre que les métabolites bactériens constituent un moyen de défense contre les bactéries pathogènes intestinales.

La présence de CA dans le surnageant de *B. fragilis* n'est pas étonnante, étant donné que CA est déconjugée par une enzyme bactérienne qui est « la bile salt hydrolase » (BSH), dont le gène est présent sur la séquence du génome de *B. fragilis* NTCC 9343. L'enzyme BSH n'est pas spécifique de *B. fragilis*. En effet, il existe sept types de BSHs, réparties chez d'autres espèces du microbiote intestinal. Parmi elles figurent la BSH-T0, qui est majoritairement représentée par le genre *Clostridium*, la BSH-T1 chez le genre *Eubacterium*, la BSH-T2 chez le genre *Streptococcus*, la BSH-T3 chez le genre *Lactobacillus*, la BSH-T4 chez le genre *Bifidobacterium*, la BSH-T5 et la BSH-T6 chez le genre *Bacteroides* et la BSH-T7 chez le genre *Blautia*, capable de déconjuguer CA et DCA (372). Pour confirmer les résultats observés avec *B. fragilis*, le surnageant de culture d'une espèce *Lactobacillus* ou *Eubacterium* par exemple, pourrait être testé *in vitro* en présence de *S. Heidelberg*. Ces résultats appuieraient l'hypothèse, que la production de CA, par certaines espèces du microbiote intestinal, pourrait contrôler la virulence du genre *Salmonella*. *B. fragilis* NTCC 9343 est une des seules souches du microbiote intestinal capable de produire CA, à partir de l'acide glycocholique (GCA) et de l'acide taurocholique (TCA). L'activité de déconjugaison des acides biliaires par l'espèce *B. fragilis* au sein de l'intestin est donc très importante (373).

Les sérovars du genre *Salmonella* ont, entre eux, des variations génétiques très importantes au niveau des gènes de virulence, notamment sur les effecteurs des SPI. Ces différences génétiques

expliquent la variation de virulence entre les souches (374). Or, les résultats d'inhibition de la translocation n'ont été déterminés que pour *Salmonella enterica* Heidelberg B182 hypermutatrice. Il pourrait être intéressant de regarder l'impact du surnageant de *B. fragilis* et de CA sur d'autres souches de *Salmonella*. Ces résultats permettraient de savoir si le mécanisme d'inhibition de la translocation est spécifique à une ou plusieurs souches de *Salmonella*. De nombreuses autres entérobactéries pathogènes opportunistes, possèdent des SST3, avec des mécanismes similaires à ceux de *Salmonella*. Parmi ces pathogènes, sont retrouvés le genre *Yersinia*, l'espèce *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) et *E. coli* entéro-hémorragique (EHEC), le genre *Shigella*, *Bordetella* ou *Vibrio* (375). Pour aller plus loin, le test d'inhibition de la translocation par *B. fragilis* et CA, pourrait être réalisé sur d'autres genres bactériens présentant la même machinerie de translocation que *Salmonella*. Ces perspectives permettront de connaître le spectre d'inhibition de *B. fragilis* vis-à-vis de la virulence des bactéries pathogènes intestinales.

Une des limites de cette étude, est que CA inhibe significativement l'expression du gène *sipA*, intervenant dans le SST3-1, mais pas significativement *fliC* intervenant dans la mobilité. Ces résultats signifieraient que d'autres molécules présentes dans le surnageant de *B. fragilis*, diminuant l'expression de *fliC*, pourraient jouer un rôle sur l'inhibition de la translocation de *S. Heidelberg*. Parmi les molécules analysées par LC-MS/MS, 22 molécules non identifiées par la base de données GNPS, sont présentes dans les fractions active F3 et F4 (371). Ces 22 molécules, pourraient par la suite être purifiées, par des séries de fractionnement ciblé, grâce à la technique de l'HPLC. Elles pourraient, par la suite, être testées en présence de *S. Heidelberg* sur le modèle *in vitro*. Cette étude permettra de savoir si une ou plusieurs autres molécules, en plus de CA, sont impliquées dans le mécanisme d'inhibition de la translocation de *S. Heidelberg*. Il est également possible que certaines molécules ne soient pas ionisables et sont donc invisibles lors de la détection en spectrométrie de masse. D'autres

techniques, telles que la GC-MS, permettraient de caractériser les AGCC (non ionisables par HPLC), puis de calculer leurs concentrations et les incubent en présence de *S. Heidelberg* sur modèle *in vitro*. Il a d'ailleurs été démontré au cours de la thèse que *B. fragilis* est capable de sécréter du propionate et du butyrate dans le milieu DMEM complet (376). Pour les molécules inconnues et non identifiables par LC-MS/MS et GC-MS, une autre technique utilisée en chimie pourrait être utilisée pour identifier les métabolites bactériens à partir des surnageants de culture. Cette technique, complémentaire de la GC-MS et de la LC-MS/MS, est dénommée la RMN (Résonance magnétique nucléaire), couplée à de la spectrométrie de masse (377). La RMN présente une analyse haute résolution et est une méthode quantitative et qualitative, robuste avec une bonne reproductibilité et répétabilité (378). La RMN permet l'identification très spécifique de la structure d'une molécule inconnue par les bases de données, comparée aux analyses LC-MS/MS et GC-MS (379). La RMN pourrait donc permettre l'identification de nouveaux métabolites bactériens produits dans des surnageants de culture par exemple.

L'implication des métabolites bactériens dans la santé humaine, a également été observée pour une autre bactérie commensale d'intérêt, *Roseburia intestinalis*. Les résultats de l'étude que nous avons menée ont montré que le surnageant de *R. intestinalis* induisait une stimulation de l'expression de *PYY* sur un modèle intestinal *in vitro* comprenant des cellules entéro-endocrines (376). Nous avons démontré, dans cette étude, que le butyrate n'était pas impliqué dans ce phénomène, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, même si la concentration de butyrate utilisée n'est pas représentative des concentrations retrouvées dans l'intestin (380). Les données de cette étude indiquent que d'autres métabolites produits par *R. intestinalis*, non identifiés, pourraient intervenir dans le processus de stimulation du gène *PYY* sur les cellules entéro-endocrines. Pour confirmer les effets stimulateurs de *PYY* par le surnageant de *R. intestinalis*, basés sur nos analyses *in vitro*,

l'administration du surnageant doit être effectuée dans un modèle murin, présentant des désordres métaboliques, retrouvés chez les obèses ou les diabétiques.

En suivant le processus d'identification des métabolites produits, comme il a été effectué pour *B. fragilis* (371), le surnageant de *R. intestinalis* pourrait à son tour, être fractionné et étudié par des analyses LC-MS/MS. Cette analyse permettrait de questionner les banques de données GNPS, afin d'identifier de potentiels métabolites qui pourraient être à l'origine du mécanisme de stimulation de PYY.

Il a été montré que *R. intestinalis* induisait une inflammation basale sur le modèle quadricellulaire en augmentant l'expression de l'*IL-8* (376). Cependant, l'étude a été réalisée dans un contexte non inflammatoire, ce qui n'est pas représentatif de la physiologie d'un patient obèse ou diabétique, chez lesquels une inflammation chronique est souvent diagnostiquée (381). L'augmentation de l'expression de l'*IL-8*, induite par le surnageant *R. intestinalis* au cours de cette étude, n'est donc pas représentative. Pour représenter les conditions inflammatoires, retrouvées dans des pathologies chroniques de l'intestin, une inflammation pourrait être préalablement induite sur le modèle quadri-cellulaire. Sur les modèles cellulaires intestinaux, l'inflammation peut être induite par administration de LPS bactériens purifiés, connus pour stimuler l'inflammation. Les LPS sont notamment retrouvés sur la membrane des entérobactéries (382). Le LPS se fixe sur le récepteur TLR-4 des cellules épithéliales. L'activation du TLR-4 conduit à l'activation des médiateurs inflammatoires impliqués dans les MICI, CRC (383). La réponse inflammatoire sur un modèle *in vitro* pourrait également être stimulée directement, par une bactérie pathogène telle que *Salmonella*. Un contexte pathologique d'inflammation permettrait de connaître, de manière plus précise, l'effet des métabolites produits par *R. intestinalis* sur la modulation de la réponse inflammatoire du modèle quadri-cellulaire.

Au cours de la thèse, les deux premiers objectifs se sont axés sur l'impact d'une bactérie isolée et de ses métabolites, sur l'épithélium intestinal (article 1, article 2). Cependant, le microbiote intestinal n'est pas limité à l'impact d'une bactérie, mais à 10^{14} bactéries, comprenant plus de 3000 espèces différentes (384). Au sein de l'intestin, les espèces bactériennes évoluent sous un aspect communautaire. Dans la littérature, il a été montré que *Faecalibacterium prausnitzii* et *Roseburia inulinivorans* producteurs de butyrate, dans un même milieu de culture bactérienne, n'étaient pas en compétition métabolique, mais additionnaient leurs taux de production d'AGCC, ce qui permet de mettre en avant, l'aspect synergique des bactéries commensales, potentiel PNGs, pour leurs effets bénéfiques, en coculture, sur la santé humaine (385).

Pour la suite, il pourrait être intéressant de complexifier la communauté bactérienne en ajoutant d'autres PNGs comme *F. prausnitzii*, producteur de butyrate ou *A. muciniphila*, producteur de propionate. La co-culture de potentiels PNGs permettrait de mimer une communauté de bactéries, connues pour leurs effets bénéfiques, mais avec des profils métaboliques différents. L'association de ces PNGs pourrait mettre en valeur les effets métaboliques synergiques, ou des effets bénéfiques, qui étaient au préalable invisible sur l'étude d'une bactérie seule (386). Il pourrait être intéressant de savoir comment évoluent la croissance des bactéries et le métabolisme impliquant leurs métabolites, comme les AGCC, puis de mettre en contact les surnageants de co-culture sur un modèle *in vitro*.

La communauté bactérienne composée par les bactéries commensales de l'intestin pourrait se complexifier par l'ajout d'une ou plusieurs bactéries pathogènes, autres que *Salmonella*, également augmentées dans les dysbioses. Cette complexification pourrait conduire à l'étude des paramètres métaboliques, bactériens ou cellulaires qui sont mis en place par une communauté bactérienne. Elle pourrait également mettre en avant les avantages d'une symbiose des potentiels PNGs avec l'épithélium intestinal, pour contrer la virulence ou la croissance des bactéries pathogènes

(entérobactéries). L'étude des communautés bactériennes intestinales, sur modèle cellulaire *in vitro*, pourrait permettre d'accélérer la découverte des mécanismes d'action mis en jeu, dans l'intestin, entre les bactéries et les cellules intestinales. L'aspect communautaire permettra également de savoir si les bactéries sont en compétition au niveau de la croissance bactérienne et sur le métabolisme (bactérien et cellulaire).

Les résultats obtenus lors de la thèse ont permis de mettre en valeur l'impact de deux potentiels PNGs et leurs métabolites, contre une bactérie pathogène (*B. fragilis*) et l'amélioration du métabolisme des cellules entéro-endocrines (*R. intestinalis*), de manière indépendante, sur des modèles intestinaux *in vitro*. La majorité des études décrites ici sont donc limitées à des analyses sur un modèle *in vitro*, mimant l'épithélium intestinal. Ces modèles multi-cellulaires présentent des limites. En effet, seuls quatre types cellulaires sont représentés, alors que l'intestin contient une multitude de types cellulaires (cellules souches, cellules immunitaires) (387). La fonction immunitaire est d'ailleurs absente du modèle quadri-cellulaire. Dans la littérature, la majorité des études portées sur l'impact des potentiels PNGs, repose sur leurs capacités à moduler l'inflammation intestinale (388). Les macrophages sont des cellules immunitaires se situant sous l'épithélium intestinal (388). La lignée cellulaire monocyte THP-1 peut se différencier en macrophages, par traitement au « phorbol 12-myristate 13-acetate » (PMA)(389). Pour ajouter une fonction immunitaire au modèle quadri-cellulaire, la lignée cellulaire THP-1 différenciée pourrait être ajoutées dans le pôle basal. Ce modèle penta-cellulaire pourrait être utilisé pour étudier les mécanismes d'action, des métabolites produits par les PNGs, seules ou en communauté, sur l'orientation d'une réponse pro ou anti-inflammatoire.

Il existe d'autres améliorations possibles du modèle intestinal. En effet, l'épithélium intestinal est une alternance entre cryptes et villi, soit une répartition en trois dimensions. Or, le modèle quadri-cellulaire utilisé au sein du laboratoire est cultivé sur insert Transwell en deux dimensions, ce qui ne

représente pas la répartition tri-dimensionnelle d'un intestin humain. De nos jours, il existe de nouveaux modèles *in vitro* qui se développent en laboratoire, amenant le paramètre de tridimensionnalité : les organoïdes. Le terme organoïde est apparu dans la littérature à partir de 2010 (390). Les organoïdes sont des structures multicellulaires tridimensionnelles, dérivées de cellules souches pluripotentes (391). Ces cellules souches assurent non seulement la tridimensionnalité, mais aussi le renouvellement de tous les types cellulaires retrouvés dans un intestin animal ou humain. Le modèle organoïde pourrait dans le futur, remplacer les modèles *in vitro* multi-cellulaires. Certaines études montrent que les organoïdes présentent une meilleure physiologie que certains modèles d'étude *in vivo* (98). La limite du modèle organoïde est qu'il est compliqué d'y injecter les bactéries et d'étudier les mécanismes comme la translocation bactérienne. La culture en 2D (tri-cellulaire ou quadri-cellulaire par exemple), comporte des propriétés intéressantes, la culture des cellules sur des inserts Transwell® permet par exemple la formation d'un pôle apical et basal. Ce système permet d'étudier les propriétés de dissémination des bactéries pathogènes, ou quantifier les molécules bactériennes ou cellulaires dans chacun des pôles. Il a été démontré qu'il est possible de cultiver les cellules intestinales en 2D, à partir des organoïdes (392). Cette technique permet d'étudier les variations métaboliques sur un modèle *in vitro* de cellules primaires comprenant l'intégralité des composants cellulaires de l'intestin.

La majorité des bactéries intestinales comprenant les PNGs sont cultivées à 37°C, en anaérobiose stricte (393). Les cellules intestinales se développent également à 37°C, mais ont la nécessité d'évoluer dans un environnement aérobie avec 5% CO₂ (84). Ces contraintes de culture entre les cellules et bactéries commensales sont problématiques, car il est impossible de cultiver les bactéries anaérobies (qui meurent au contact de l'oxygène) en contact des modèles intestinaux *in vitro*. C'est pour cette raison que les interactions entre les cellules intestinales avec les surnageants bactériens sont

privilégées pour étudier les mécanismes d'action. Pour contrer cette problématique, le système « Gut-on-a-Chip » a été développé en 2007 (96,394). Le système est construit avec des matériaux imperméables à l'oxygène. Ainsi, un gradient d'oxygène est décroissant du pôle basal vers le pôle apical. Une pompe de recirculation permet de maintenir la normoxie dans le compartiment basolatéral, tandis que le pôle apical contenant les bactéries anaérobies est dépourvu d'oxygène. Pour garder les conditions sans oxygène, une pompe à injection a été mise en place pour ajouter les bactéries anaérobies. Le système est également composé de sondes, permettant de contrôler la concentration d'oxygène. Ce système a permis de maintenir, de manière viable, la culture de *F. prausnitzii* et sa production de butyrate pendant quatre jours (96). Il améliore donc la physiologie des bactéries en culture *in vitro*, vis-à-vis des conditions retrouvées dans l'intestin.

Il a été décrit dans la revue que les métabolites bactériens, sont absorbés par l'intestin, puis rejoignent la circulation sanguine, pour atteindre d'autres organes comme les poumons, en exerçant des effets protecteurs (350). La plupart des effets bénéfiques décrits, sont issus d'études *in vivo*. Les mécanismes d'action qui sont mis en jeu dans les axes intestin-poumons, intestin-cerveau ou encore intestin-foie, sont compliqués à étudier dans des organismes aussi complexes. Pour aller plus loin, les surnageant des pôles basaux et apicaux d'une culture de cellules intestinales en présence d'une communauté bactérienne définie, pourraient être récupérés et mis en contact de lignées cellulaires pulmonaires, cérébrales ou encore hépatocytaires. Il a été montré que *F. prausnitzii*, *Akkermansia*, *Clostridium*, *Ruminococcus* étaient diminuées dans le cas de mucoviscidose (395). La lignée conférant une mutation du gène « Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » (CFTR), mime un épithélium pulmonaire défectueux, s'apparentant à l'épithélium d'un patient atteint de mucoviscidose (396). Le surnageant, issu d'une interaction communauté bactéries-cellules intestinales, pourrait être ajouté sur cette lignée pulmonaire, pour étudier les mécanismes qui relient l'axe intestin-poumons.

L'étude de l'impact du surnageant bactérien et cellulaire pourrait permettre l'identification de nouveaux métabolites, ayant une action à distance sur les poumons et pourraient être utilisés comme traitement contre les pathologies pulmonaires chroniques.

Depuis plusieurs années maintenant, l'axe intestin-cerveau est de plus en plus décrit. En effet, une perturbation du microbiote intestinal pourrait entraîner des pathologies neurologiques telles que la dépression, l'anorexie, la maladie de Parkinson, Alzheimer ou encore des troubles du spectre de l'autisme (337). D'autres études, liant l'intestin et le foie, montrent que des pathologies du foie pourraient être en lien avec les dysbioses intestinales (397–399). En utilisant le même raisonnement que pour l'axe intestin-poumons, les surnageants des pôles basaux et apicaux pourraient être incubés de manière indépendante sur des neurones, avec la lignée SH-S75Y (400,401). Ces études approfondies permettraient de comprendre les processus en jeu entre les bactéries commensales intestinales et l'homéostasie des organes.

Les études sur le microbiote intestinal sont encore très récentes. Les données cliniques sur l'administration des PNGs, comme traitement, sont encore en cours de progression. Actuellement, chez l'Homme, le seul traitement thérapeutique autorisé s'appuie sur la transplantation fécale pour les patients atteints d'une infection à *Clostridium difficile*, une bactérie pathogène intestinale, multirésistante aux antibiotiques (402,403). Le taux de guérison, par cette méthode, est de 80%, ce qui met en avant le potentiel thérapeutique des PNGs. Cependant, cette thérapie est très contrôlée, et de nombreuses questions éthiques se posent, car l'administration d'organismes vivants, issus du microbiote intestinal, pour traiter des pathologies chroniques, est sujet à débat. De plus, la composition du contenu fécale utilisé pour la transplantation, regroupe une multitude d'espèces bactériennes, sans connaître la composition exacte. Le mécanisme d'action de la transplantation fécale se base sur des analyses phénotypiques, d'un microbiote composé de bactéries commensales,

considérée comme bénéfique, chez un patient sain, remplaçant la flore intestinale considérée comme défectueuse, d'un patient malade.

Une étude clinique menée par l'équipe de Patrice Cani en 2019, a démontré que l'administration de 10^{10} bactéries *A. muciniphila* vivantes ou pasteurisées, sur des patients obèses améliorait leur diagnostic. La sensibilité à l'insuline, les marqueurs sanguins issus d'un dysfonctionnement hépatique, inflammatoire et de certains facteurs cardiaques étaient diminués sans altération de la structure du microbiome intestinal (326). Cette étude clinique est la preuve que l'administration des PNGs est bien tolérée et améliore les paramètres métaboliques dans le cas de pathologies chroniques, chez l'Homme. La réussite d'autres études cliniques pourrait, à long terme, permettre la mise en place de probiotiques thérapeutique de nouvelle génération. Le but est de s'affranchir du don de selles en cultivant les souches issues du microbiote intestinal, potentiellement bénéfiques chez l'Homme, puis de les délivrer comme médicaments. Néanmoins, les études cliniques sur les potentiels PNGs sont encore peu nombreuses pour les utiliser dans le cadre de santé humaine.

De nombreuses questions se posent encore sur le mode d'administration des bactéries intestinales. Le premier paramètre à prendre en compte est la dose de bactéries à administrer, pour assurer l'efficacité des effets recherchés, sans ajouter d'effets secondaires nocifs chez le patient. Le second paramètre est le mode d'encapsulation des bactéries. Les bactéries intestinales peuvent être fragiles, leur administration par voie orale doit contenir les bactéries vivantes jusqu'à l'intestin. Pour accentuer l'efficacité des bactéries intestinales, il reste encore à déterminer si les bactéries doivent être administrées seules ou à plusieurs, pour profiter de la synergie communautaire. Pour augmenter l'efficacité de l'administration des probiotiques, une autre composante peut être ajoutée, les prébiotiques qui sont « des substances alimentaires (consistant surtout en polysaccharides à l'exclusion de l'amidon et oligosaccharides non digestibles par les enzymes humaines), qui nourrissent

un groupe sélectif de micro-organismes vivants dans l'intestin ». Les prébiotiques stimulent la croissance et le métabolisme des bactéries commensales intestinales. Il a été montré, par exemple, que la supplémentation de polyphénols en tant que prébiotiques stimule la production d'AGCC et augmente l'abondance de bactéries considérées comme bénéfiques telle que *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia*, *Roseburia* et *Faecalibacterium* (404).

Ces différents paramètres montrent que les études *in vitro* et *in vivo*, sur les mécanismes d'action des probiotiques seules, ou en communauté, avec ou sans la présence de pré-biotiques, sont encore des domaines nécessitant de nombreuses études. Ces études pourraient permettre d'assurer l'efficacité et la mise en place de traitements, thérapeutiques ou préventifs, chez l'Homme, contre des pathologies spécifiques intestinales et même extra-intestinales.

VI) Références

1. Lopez PP, Gogna S, Khorasani-Zadeh A. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Duodenum. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Aug 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482390/>
2. Sundin OH, Mendoza-Ladd A, Zeng M, Diaz-Arévalo D, Morales E, Fagan BM, et al. The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiology*. 2017 Jul 17;17(1):160.
3. Panneerselvam D, Vaqar S. Peyer Patches. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Oct 4]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557457/>
4. Ileum [Internet]. Kenhub. [cited 2022 Aug 22]. Available from: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-ileum>
5. Azzouz LL, Sharma S. Physiology, Large Intestine. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Sep 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507857/>
6. Sulaiman S, Marciani L. MRI of the Colon in the Pharmaceutical Field: The Future before us. *Pharmaceutics*. 2019 Mar 27;11(4):146.
7. Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Grundy D. Gastrointestinal Physiology and Function. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;239:1–16.
8. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*. 2006 May;7(5):349–59.
9. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Mar;14(3):141–53.
10. Laksitorini M, Prasasty VD, Kiptoo PK, Siahaan TJ. Pathways and Progress in Improving Drug Delivery through the Intestinal Mucosa and Blood-Brain Barriers. *Ther Deliv*. 2014 Oct;5(10):1143–63.
11. Wong ACN, Vanhove AS, Watnick PI. The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Dis Model Mech*. 2016 Mar;9(3):271–81.
12. Shi J, Barakat M, Chen D, Chen L. Bicellular Tight Junctions and Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Dec;19(12):3862.
13. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2003 Jan 1;81(1):1–44.

14. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 2011 Feb 18;585(4):606–12.
15. Inai T, Kobayashi J, Shibata Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol.* 1999 Dec;78(12):849–55.
16. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998 Jul 13;142(1):117–27.
17. Ludwig RJ, Zollner TM, Santoso S, Hardt K, Gille J, Baatz H, et al. Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol.* 2005 Nov;125(5):969–76.
18. Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, et al. Establishment and Characterization of Cultured Epithelial Cells Lacking Expression of ZO-1*. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Oct 22;279(43):44785–94.
19. Costea L, Mészáros Á, Bauer H, Bauer HC, Traweger A, Wilhelm I, et al. The Blood–Brain Barrier and Its Intercellular Junctions in Age-Related Brain Disorders. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 3;20(21):5472.
20. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Jul;36(7):1206–37.
21. Cummins PM. Occludin: One Protein, Many Forms. *Mol Cell Biol.* 2012 Jan;32(2):242–50.
22. Paradis T, Bègue H, Basmacıyan L, Dalle F, Bon F. Tight Junctions as a Key for Pathogens Invasion in Intestinal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 2;22(5):2506.
23. Yuhan R, Koutsouris A, Savkovic SD, Hecht G. Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 1997 Dec;113(6):1873–82.
24. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Nov;65(23):3756–88.
25. Yulis M, Kusters DHM, Nusrat A. Cadherins: cellular adhesive molecules serving as signalling mediators. *J Physiol.* 2018 Sep 1;596(17):3883–98.
26. Ungewiß H, Vielmuth F, Suzuki ST, Maiser A, Harz H, Leonhardt H, et al. Desmoglein 2 regulates the intestinal epithelial barrier via p38 mitogen-activated protein kinase. *Sci Rep.* 2017 Jul 24;7:6329.
27. Meşe G, Richard G, White TW. Gap Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology.* 2007 Nov 1;127(11):2516–24.

28. Kim YS, Ho SB. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010;12(5):319–30.
29. Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, de Zoete MR, Palm NW, Bailis W, et al. Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell*. 2015 Dec 3;163(6):1444–56.
30. Corfield AP. The Interaction of the Gut Microbiota with the Mucus Barrier in Health and Disease in Human. *Microorganisms*. 2018 Aug 2;6(3):E78.
31. Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006 Jul;131(1):117–29.
32. Li JD, Feng W, Gallup M, Kim JH, Gum J, Kim Y, et al. Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5718–23.
33. Ahn D ho, Crawley SC, Hokari R, Kato S, Yang SC, Li JD, et al. TNF-alpha activates MUC2 transcription via NF-kappaB but inhibits via JNK activation. *Cell Physiol Biochem*. 2005;15(1–4):29–40.
34. Järvå MA, Lingford JP, John A, Soler NM, Scott NE, Goddard-Borger ED. Trefoil factors share a lectin activity that defines their role in mucus. *Nat Commun*. 2020 May 13;11(1):2265.
35. Aihara E, Engevik KA, Montrose MH. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79:357–80.
36. Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*. 1996 Oct 11;274(5285):262–5.
37. Stern M, Walker WA. Food proteins and gut mucosal barrier I. Binding and uptake of cow's milk proteins by adult rat jejunum in vitro. *Am J Physiol*. 1984 May;246(5 Pt 1):G556-562.
38. Traber PG, Yu L, Wu GD, Judge TA. Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villus axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance. *Am J Physiol*. 1992 Jan;262(1 Pt 1):G123-130.
39. Gericke B, Schecker N, Amiri M, Naim HY. Structure-function analysis of human sucrase-isomaltase identifies key residues required for catalytic activity. *J Biol Chem*. 2017 Jun 30;292(26):11070–8.
40. Naim HY, Sterchi EE, Lentze MJ. Biosynthesis of the human sucrase-isomaltase complex. Differential O-glycosylation of the sucrase subunit correlates with its position within the enzyme complex. *J Biol Chem*. 1988 May 25;263(15):7242–53.

41. Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab.* 2009 May;9(5):461–73.
42. Lallès JP. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr Rev.* 2014 Feb;72(2):82–94.
43. May CL, Kaestner KH. Gut Endocrine Cell Development. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Jul 8;323(1):70–5.
44. Sternini C, Anselmi L, Rozengurt E. Enteroendocrine cells: a site of ‘taste’ in gastrointestinal chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008 Feb;15(1):73–8.
45. Prosapio JG, Sankar P, Jialal I. Physiology, Gastrin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Sep 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534822/>
46. Wu JT, Kral JG. Ghrelin. *Ann Surg.* 2004 Apr;239(4):464–74.
47. Dharmasathaphorn K. Intestinal somatostatin function. *Adv Exp Med Biol.* 1985;188:463–73.
48. Rehfeld JF. Cholecystokinin—From Local Gut Hormone to Ubiquitous Messenger. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Apr 13;8:47.
49. Le HTMD, Lie KK, Giroud-Argoud J, Rønnestad I, Sæle Ø. Effects of Cholecystokinin (CCK) on Gut Motility in the Stomachless Fish Ballan Wrasse (*Labrus bergylta*). *Frontiers in Neuroscience* [Internet]. 2019 [cited 2022 Sep 23];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00553>
50. Bruta K, Vanshika, Bhasin K, Bhawana. The role of serotonin and diet in the prevalence of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Translational Medicine Communications.* 2021 Jan 5;6(1):1.
51. Sikander A, Rana SV, Prasad KK. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clinica Chimica Acta.* 2009 May 1;403(1):47–55.
52. Kuhre RE, Holst JJ, Kappe C. The regulation of function, growth and survival of GLP-1-producing L-cells. *Clin Sci (Lond).* 2016 Jan;130(2):79–91.
53. Karra E, Chandarana K, Batterham RL. The role of peptide YY in appetite regulation and obesity. *J Physiol.* 2009 Jan 1;587(Pt 1):19–25.
54. Haynes JM, Hill SJ, Selbie LA. Neuropeptide Y (NPY) and peptide YY (PYY) effects in the epididymis of the guinea-pig: evidence of a pre-junctional PYY-selective receptor. *Br J Pharmacol.* 1997 Dec;122(7):1530–6.

55. Bandyopadhyay GK, Mahata SK. Chromogranin A Regulation of Obesity and Peripheral Insulin Sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:20.
56. Egger M, Beer AGE, Theurl M, Schgoer W, Hotter B, Tatarczyk T, et al. Monocyte migration: a novel effect and signaling pathways of catestatin. *Eur J Pharmacol*. 2008 Nov 19;598(1–3):104–11.
57. Lueschow SR, McElroy SJ. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Frontiers in Immunology [Internet]*. 2020 [cited 2022 Aug 22];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00587>
58. Salzman NH. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome. *Gut Microbes*. 2010;1(6):401–6.
59. Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Jan;59(1):156–70.
60. Sankaran-Walters S, Hart R, Dills C. Guardians of the Gut: Enteric Defensins. *Front Microbiol*. 2017 Apr 19;8:647.
61. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, et al. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*. 2011 Oct 14;334(6053):255–8.
62. Miki T, Goto R, Fujimoto M, Okada N, Hardt WD. The Bactericidal Lectin RegIII β Prolongs Gut Colonization and Enteropathy in the Streptomycin Mouse Model for Salmonella Diarrhea. *Cell Host & Microbe*. 2017 Feb 8;21(2):195–207.
63. Perniss A, Schmidt P, Soultanova A, Papadakis T, Dahlke K, Voigt A, et al. Development of epithelial cholinergic chemosensory cells of the urethra and trachea of mice. *Cell Tissue Res*. 2021;385(1):21–35.
64. Schneider C, O’Leary CE, Locksley RM. Regulation of immune responses by tuft cells. *Nat Rev Immunol*. 2019 Sep;19(9):584–93.
65. Bjerknes M, Khandanpour C, Möröy T, Fujiyama T, Hoshino M, Klisch TJ, et al. Origin of the brush cell lineage in the mouse intestinal epithelium. *Dev Biol*. 2012 Feb 15;362(2):194–218.
66. Hendel SK, Kellermann L, Hausmann A, Bindslev N, Jensen KB, Nielsen OH. Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. *Frontiers in Immunology [Internet]*. 2022 [cited 2022 Sep 23];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.822867>
67. Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, et al. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol*. 2009 Nov 1;183(9):5738–47.

68. Cook DN, Prosser DM, Forster R, Zhang J, Kuklin NA, Abbondanzo SJ, et al. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity*. 2000 May;12(5):495–503.
69. Mabbott NA, Kenneth Baillie J, Hume DA, Freeman TC. Meta-analysis of lineage-specific gene expression signatures in mouse leukocyte populations. *Immunobiology*. 2010 Oct;215(9–10):724–36.
70. Roberts CL, Keita AV, Duncan SH, O’Kennedy N, Söderholm JD, Rhodes JM, et al. Translocation of Crohn’s disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut*. 2010 Oct;59(10):1331–9.
71. Jepson MA, Clark MA. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes Infect*. 2001 Dec;3(14–15):1183–90.
72. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol*. 2018 Sep;39(9):677–96.
73. Heel KA, McCauley RD, Papadimitriou JM, Hall JC. Review: Peyer’s patches. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997 Feb;12(2):122–36.
74. Cornes JS. Number, size, and distribution of Peyer’s patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer’s patches. *Gut*. 1965 Jun;6(3):225–9.
75. Rey J, Garin N, Spertini F, Corthésy B. Targeting of secretory IgA to Peyer’s patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):3026–33.
76. Bakema JE, van Egmond M. Immunoglobulin A. *MAbs*. 2011;3(4):352–61.
77. Sipos F, Múzes G. Isolated lymphoid follicles in colon: Switch points between inflammation and colorectal cancer? *World J Gastroenterol*. 2011 Apr 7;17(13):1666–73.
78. Bamias G, Cominelli F. Cytokines and intestinal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol*. 2016 Nov;32(6):437–42.
79. DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol*. 2001 Mar;39(3):209–28.
80. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech*. 2015 Jan;8(1):1–16.
81. Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutr Res Rev*. 2010 Jun;23(1):4–22.
82. Costa J, Ahluwalia A. Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019 Jun 18;7:144.

83. Lahar N, Lei NY, Wang J, Jabaji Z, Tung SC, Joshi V, et al. Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. *PLoS One*. 2011;6(11):e26898.
84. Aldhous MC, Shmakov AN, Bode J, Ghosh S. Characterization of conditions for the primary culture of human small intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2001 Jul;125(1):32–40.
85. Kaur G, Dufour JM. Cell lines. *Spermatogenesis*. 2012 Jan 1;2(1):1–5.
86. Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol*. 2007 Jul 1;23(4):241–56.
87. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 1989 Mar;96(3):736–49.
88. Antunes F, Andrade F, Araújo F, Ferreira D, Sarmento B. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013 Apr;83(3):427–35.
89. Pontier C, Pachot J, Botham R, Lenfant B, Arnaud P. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J Pharm Sci*. 2001 Oct;90(10):1608–19.
90. Araújo F, Sarmento B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. *Int J Pharm*. 2013 Dec 15;458(1):128–34.
91. Vernay T, Cannie I, Gaboriau F, Gall SDL, Tamanai-Shacoori Z, Burel A, et al. *Bacteroides fragilis* prevents *Salmonella* Heidelberg translocation in co-culture model mimicking intestinal epithelium. *Beneficial Microbes*. 2020 Aug;11(4):391–401.
92. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014 Nov;23(1):37–45.
93. de Bruïne AP, Dinjens WN, Pijls MM, vd Linden EP, Rousch MJ, Moerkerk PT, et al. NCI-H716 cells as a model for endocrine differentiation in colorectal cancer. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1992;62(5):311–20.
94. Ashammakhi N, Nasiri R, Roberto De Barros N, Tebon P, Thakor J, Goudie M, et al. Gut-on-a-chip: Current Progress and Future Opportunities. *Biomaterials*. 2020 Oct;255:120196.
95. Xiang Y, Wen H, Yu Y, Li M, Fu X, Huang S. Gut-on-chip: Recreating human intestine in vitro. *J Tissue Eng*. 2020 Nov 18;11:2041731420965318.
96. Davenport Hoyer L, Radisic M. An Organ-on-a-Chip System to Study Anaerobic Bacteria in Intestinal Health and Disease. *Med*. 2021 Jan 15;2(1):16–8.

97. Sung JH, Yu J, Luo D, Shuler ML, March JC. Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model. *Lab Chip*. 2011 Feb 7;11(3):389–92.
98. Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(10):571–84.
99. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009 May 14;459(7244):262–5.
100. Date S, Sato T. Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2015;31:269–89.
101. Meneses AMC, Schneeberger K, Kruitwagen HS, Penning LC, van Steenbeek FG, Burgener IA, et al. Intestinal Organoids—Current and Future Applications. *Vet Sci*. 2016 Oct 21;3(4):31.
102. Zachos NC, Kovbasnjuk O, Foulke-Abel J, In J, Blutt SE, de Jonge HR, et al. Human Enteroids/Colonoids and Intestinal Organoids Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology. *J Biol Chem*. 2016 Feb 19;291(8):3759–66.
103. Leslie JL, Huang S, Opp JS, Nagy MS, Kobayashi M, Young VB, et al. Persistence and Toxin Production by *Clostridium difficile* within Human Intestinal Organoids Result in Disruption of Epithelial Paracellular Barrier Function. *Infect Immun*. 2015 Jan;83(1):138–45.
104. Park NY, Koh A. From the Dish to the Real World: Modeling Interactions between the Gut and Microorganisms in Gut Organoids by Tailoring the Gut Milieu. *Int J Stem Cells*. 2022 Feb 28;15(1):70–84.
105. Fan X, Jin Y, Chen G, Ma X, Zhang L. Gut Microbiota Dysbiosis Drives the Development of Colorectal Cancer. *DIG*. 2021;102(4):508–15.
106. Yang Y, Qu L, Mijakovic I, Wei Y. Advances in the human skin microbiota and its roles in cutaneous diseases. *Microb Cell Fact*. 2022 Aug 29;21:176.
107. Sommariva M, Le Noci V, Bianchi F, Camelliti S, Balsari A, Tagliabue E, et al. The lung microbiota: role in maintaining pulmonary immune homeostasis and its implications in cancer development and therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Jul 1;77(14):2739–49.
108. Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Fact*. 2020 Nov 7;19:203.
109. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017 Jun 1;474(11):1823–36.
110. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan 10;7(1):14.

111. Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czejek M, Michel G. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. *Front Microbiol.* 2011 May 30;2:93.
112. Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig Liver Dis.* 2018 May;50(5):421–8.
113. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9351507.
114. Plovier H, Cani PD. Akkermansia muciniphila, une bactérie pour lutter contre le syndrome métabolique - Optimisation des effets bénéfiques et évaluation de la sûreté chez l'homme. *Med Sci (Paris).* 2017 Apr 1;33(4):373–5.
115. Thurnheer T, Karygianni L, Flury M, Belibasakis GN. Fusobacterium Species and Subspecies Differentially Affect the Composition and Architecture of Supra- and Subgingival Biofilms Models. *Front Microbiol.* 2019 Jul 30;10:1716.
116. Schluter J, Foster KR. The Evolution of Mutualism in Gut Microbiota Via Host Epithelial Selection. *PLoS Biol.* 2012 Nov 20;10(11):e1001424.
117. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.* 2018;57(1):1–24.
118. Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N. Microbiote intestinale et développement du système immunitaire. *Med Sci (Paris).* 2016 Nov 1;32(11):961–7.
119. Kastl AJ, Terry NA, Wu GD, Albenberg LG. The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* 2020 Jan 1;9(1):33–45.
120. Albenberg L, Esipova T, Judge C, Bittinger K, Chen J, Laughlin A, et al. Correlation Between Intraluminal Oxygen Gradient and Radial Partitioning of Intestinal Microbiota in Humans and Mice. *Gastroenterology.* 2014 Nov;147(5):1055-1063.e8.
121. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp.* 2012 Feb 9;2:3.
122. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015 Aug 7;21(29):8787–803.
123. Rolhion N, Chassaing B. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016 Nov 5;371(1707):20150504.
124. Shao Y, Forster SC, Tsaliki E, Vervier K, Strang A, Simpson N, et al. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonisation in caesarean section birth. *Nature.* 2019 Oct;574(7776):117–21.

125. Gorbach SL. Microbiology of the Gastrointestinal Tract. In: Baron S, editor. Medical Microbiology [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2022 Oct 24]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7670/>
126. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. 2018 Oct;562(7728):583–8.
127. Hu J, Nomura Y, Bashir A, Fernandez-Hernandez H, Itzkowitz S, Pei Z, et al. Diversified Microbiota of Meconium Is Affected by Maternal Diabetes Status. *PLOS ONE*. 2013 Nov 6;8(11):e78257.
128. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017 Nov 8;81(4):e00036-17.
129. Neu J, Rushing J. Cesarean versus Vaginal Delivery: Long term infant outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clin Perinatol*. 2011 Jun;38(2):321–31.
130. Coman V, Vodnar DC. Gut microbiota and old age: Modulating factors and interventions for healthy longevity. *Exp Gerontol*. 2020 Nov;141:111095.
131. Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao J zhong, et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiology*. 2016 May 25;16(1):90.
132. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):237–64.
133. STACKEBRANDT E, GOEBEL BMY 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 44(4):846–9.
134. Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res*. 2010 Dec;38(22):e200.
135. Fadeev E, Cardozo-Mino MG, Rapp JZ, Bienhold C, Salter I, Salman-Carvalho V, et al. Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2021 [cited 2022 Aug 25];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.637526>
136. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007 Sep;45(9):2761–4.

137. Su X. Elucidating the Beta-Diversity of the Microbiome: from Global Alignment to Local Alignment. *mSystems*. 6(4):e00363-21.
138. Zeng M, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2017 Jan;10(1):18–26.
139. Gillis CC, Hughes ER, Spiga L, Winter MG, Zhu W, de Carvalho TF, et al. Dysbiosis-associated change in host metabolism generates lactate to support Salmonella growth. *Cell Host Microbe*. 2018 Jan 10;23(1):54-64.e6.
140. Ryan FJ, Ahern AM, Fitzgerald RS, Laserna-Mendieta EJ, Power EM, Clooney AG, et al. Colonic microbiota is associated with inflammation and host epigenomic alterations in inflammatory bowel disease. *Nat Commun*. 2020 Mar 23;11(1):1512.
141. Alam MT, Amos GCA, Murphy ARJ, Murch S, Wellington EMH, Arasaradnam RP. Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels. *Gut Pathog*. 2020 Jan 4;12:1.
142. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 May;22(5):1137–50.
143. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis*. 2015 Feb 2;26:10.3402/mehd.v26.26191.
144. Buttó LF, Haller D. Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. *Int J Med Microbiol*. 2016 Aug;306(5):302–9.
145. Parkin K, Christophersen CT, Verhasselt V, Cooper MN, Martino D. Risk Factors for Gut Dysbiosis in Early Life. *Microorganisms*. 2021 Sep 30;9(10):2066.
146. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480–4.
147. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):789–99.
148. Wang J, Xiang R, Wang R, Zhang B, Gong W, Zhang J, et al. The variable oligomeric state of Amuc_1100 from *Akkermansia muciniphila*. *J Struct Biol*. 2020 Oct 1;212(1):107593.
149. Knights D, Silverberg MS, Weersma RK, Gevers D, Dijkstra G, Huang H, et al. Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Medicine*. 2014 Dec 2;6(12):107.
150. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):603–6.

151. Momozawa Y, Dmitrieva J, Théâtre E, Deffontaine V, Rahmouni S, Charlotheaux B, et al. IBD risk loci are enriched in multigenic regulatory modules encompassing putative causative genes. *Nat Commun.* 2018 Jun 21;9(1):2427.
152. McDowell C, Farooq U, Haseeb M. Inflammatory Bowel Disease. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2023 Jan 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470312/>
153. Sun L, Nava GM, Stappenbeck TS. Host genetic susceptibility, dysbiosis and viral triggers in IBD. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011 Jul;27(4):321–7.
154. Angoa-Pérez M, Zagorac B, Francescutti DM, Winters AD, Greenberg JM, Ahmad MM, et al. Effects of a high fat diet on gut microbiome dysbiosis in a mouse model of Gulf War Illness. *Sci Rep.* 2020 Jun 12;10(1):9529.
155. Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Advances in Nutrition.* 2020 Jan 1;11(1):77–91.
156. Martinez KB, Leone V, Chang EB. Western diets, gut dysbiosis, and metabolic diseases: Are they linked? *Gut Microbes.* 2017 Jan 6;8(2):130–42.
157. Nagpal R, Shively CA, Register TC, Craft S, Yadav H. Gut microbiome-Mediterranean diet interactions in improving host health. *F1000Res.* 2019 May 21;8:699.
158. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Alcalá-Díaz JF, Perez-Caballero AI, Gomez-Delgado F, et al. CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREvention study (the CORDIOPREV study): Rationale, methods, and baseline characteristics: A clinical trial comparing the efficacy of a Mediterranean diet rich in olive oil versus a low-fat diet on cardiovascular disease in coronary patients. *Am Heart J.* 2016 Jul;177:42–50.
159. Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J.* 2015 Jul;56(7):366–7.
160. Zhang S, Chen DC. Facing a new challenge: the adverse effects of antibiotics on gut microbiota and host immunity. *Chin Med J (Engl).* 2019 May 20;132(10):1135–8.
161. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med.* 2016 Jun;22(6):458–78.
162. Strati F, Pujolassos M, Burrello C, Giuffrè MR, Lattanzi G, Caprioli F, et al. Antibiotic-associated dysbiosis affects the ability of the gut microbiota to control intestinal inflammation upon fecal microbiota transplantation in experimental colitis models. *Microbiome.* 2021 Feb 6;9(1):39.
163. Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hämäläinen AM, Härkönen T, Ryhänen SJ, et al. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci Transl Med.* 2016 Jun 15;8(343):343ra81.

164. Ianiro G, Mullish BH, Kelly CR, Kassam Z, Kuijper EJ, Ng SC, et al. Reorganisation of faecal microbiota transplant services during the COVID-19 pandemic. *Gut*. 2020 Sep;69(9):1555–63.
165. Sultan S, El-Mowafy M, Elgaml A, Ahmed TAE, Hassan H, Mottawea W. Metabolic Influences of Gut Microbiota Dysbiosis on Inflammatory Bowel Disease. *Front Physiol*. 2021 Sep 27;12:715506.
166. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004 May;53(5):685–93.
167. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn’s disease and their unaffected relatives. *Gut*. 2011 May;60(5):631–7.
168. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Aug;15(8):1183–9.
169. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology*. 2010 Dec;139(6):1844-1854.e1.
170. Zhou Y, Zhi F. Lower Level of *Bacteroides* in the Gut Microbiota Is Associated with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5828959.
171. Schwiertz A, Jacobi M, Frick JS, Richter M, Rusch K, Köhler H. Microbiota in pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr*. 2010 Aug;157(2):240-244.e1.
172. Lepage P, Häslér R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, et al. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2011 Jul;141(1):227–36.
173. Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, et al. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn’s disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Apr;28(4):613–9.
174. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyaya I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 7;20(5):1192–210.
175. Schultz BM, Paduro CA, Salazar GA, Salazar-Echegarai FJ, Sebastián VP, Riedel CA, et al. A Potential Role of *Salmonella* Infection in the Onset of Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol*. 2017 Feb 28;8:191.
176. Pisani A, Rausch P, Bang C, Ellul S, Tabone T, Marantidis Cordina C, et al. Dysbiosis in the Gut Microbiota in Patients with Inflammatory Bowel Disease during Remission. *Microbiology Spectrum*. 2022 May 9;10(3):e00616-22.

177. Rebersek M. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2021 Dec 11;21(1):1325.
178. Mughini-Gras L, Schaapveld M, Kramers J, Mooij S, Neefjes-Borst EA, van Pelt W, et al. Increased colon cancer risk after severe Salmonella infection. *PLoS One*. 2018 Jan 17;13(1):e0189721.
179. Duijster JW, Hansen JV, Franz E, Neefjes JJC, Frisch M, Mughini-Gras L, et al. Association between Salmonella infection and colon cancer: a nationwide registry-based cohort study. *Epidemiol Infect*. 2021 Feb 8;149:e56.
180. Collier-Hyams LS, Zeng H, Sun J, Tomlinson AD, Bao ZQ, Chen H, et al. Cutting edge: Salmonella AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol*. 2002 Sep 15;169(6):2846–50.
181. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res*. 2012 Feb;22(2):299–306.
182. Raskov H, Burcharth J, Pommergaard HC. Linking Gut Microbiota to Colorectal Cancer. *J Cancer*. 2017 Sep 20;8(17):3378–95.
183. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*. 2013 Aug 14;14(2):195–206.
184. Secher T, Samba-Louaka A, Oswald E, Nougayrède JP. *Escherichia coli* Producing Colibactin Triggers Premature and Transmissible Senescence in Mammalian Cells. *PLOS ONE*. 2013 Oct 8;8(10):e77157.
185. Sears CL, Garrett WS. Microbes, Microbiota and Colon Cancer. *Cell Host Microbe*. 2014 Mar 12;15(3):317–28.
186. Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J*. 2012 Feb;6(2):320–9.
187. Ahn J, Sinha R, Pei Z, Dominianni C, Wu J, Shi J, et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Dec 18;105(24):1907–11.
188. Okumura S, Konishi Y, Narukawa M, Sugiura Y, Yoshimoto S, Arai Y, et al. Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumorigenesis via butyrate secretion. *Nat Commun*. 2021 Sep 28;12(1):5674.
189. Kesh K, Mendez R, Abdelrahman L, Banerjee S, Banerjee S. Type 2 diabetes induced microbiome dysbiosis is associated with therapy resistance in pancreatic adenocarcinoma. *Microbial Cell Factories*. 2020 Mar 24;19(1):75.

190. Grasset E, Puel A, Charpentier J, Collet X, Christensen JE, Tercé F, et al. A Specific Gut Microbiota Dysbiosis of Type 2 Diabetic Mice Induces GLP-1 Resistance through an Enteric NO-Dependent and Gut-Brain Axis Mechanism. *Cell Metab.* 2017 May 2;25(5):1075-1090.e5.
191. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 28;110(22):9066–71.
192. Greer RL, Dong X, Moraes ACF, Zielke RA, Fernandes GR, Peremyslova E, et al. *Akkermansia muciniphila* mediates negative effects of IFN γ on glucose metabolism. *Nat Commun.* 2016 Nov 14;7(1):13329.
193. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One.* 2013;8(8):e71108.
194. Neyrinck AM, Possemiers S, Druart C, Van de Wiele T, De Backer F, Cani PD, et al. Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in diet-induced obese mice. *PLoS One.* 2011;6(6):e20944.
195. Gurung M, Li Z, You H, Rodrigues R, Jump DB, Morgun A, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *eBioMedicine* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Oct 25];51. Available from: <https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS235239641930800-X/fulltext#gr1>
196. Anhe FF, Jensen BAH, Varin TV, Servant F, Van Blerk S, Richard D, et al. Type 2 diabetes influences bacterial tissue compartmentalisation in human obesity. *Nat Metab.* 2020 Mar;2(3):233–42.
197. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012 Oct 4;490(7418):55–60.
198. Santacruz A, Marcos A, Wärnberg J, Martí A, Martín-Matillas M, Campoy C, et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring).* 2009 Oct;17(10):1906–15.
199. Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2016 Feb;113(5):72–82.
200. Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Dec 15;8(12):22529–42.
201. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004 May;126(6):1504–17.
202. Blachier F, Beaumont M, Kim E. Cysteine-derived hydrogen sulfide and gut health: a matter of endogenous or bacterial origin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2019 Jan;22(1):68–75.

203. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015 Jan;31(1):69–75.
204. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Oct;9(10):577–89.
205. Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2007 Sep;102(9):2058–69.
206. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123–32.
207. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):329–42.
208. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*. 2021 Oct 1;14(10):101174.
209. Adelstein BA, Macaskill P, Chan SF, Katelaris PH, Irwig L. Most bowel cancer symptoms do not indicate colorectal cancer and polyps: a systematic review. *BMC Gastroenterol*. 2011 May 30;11:65.
210. Thiele Orberg E, Fan H, Tam AJ, Dejea CM, Destefano Shields CE, Wu S, et al. The myeloid immune signature of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced murine colon tumorigenesis. *Mucosal Immunol*. 2017 Mar;10(2):421–33.
211. Skrypnik D, Bogdański P, Musialik K. [Obesity--significant risk factor for erectile dysfunction in men]. *Pol Merkur Lekarski*. 2014 Feb;36(212):137–41.
212. Kyrou I, Randeve HS, Tsigos C, Kaltsas G, Weickert MO. Clinical Problems Caused by Obesity. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2022 Oct 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278973/>
213. Wondmkun YT. Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Oct 9;13:3611–6.
214. Yan Y, Sha Y, Yao G, Wang S, Kong F, Liu H, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass Versus Medical Treatment for Type 2 Diabetes Mellitus in Obese Patients. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Apr 29;95(17):e3462.
215. Zeng MY, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2017 Jan;10(1):18–26.
216. Zha L, Garrett S, Sun J. Salmonella Infection in Chronic Inflammation and Gastrointestinal Cancer. *Diseases*. 2019 Mar 10;7(1):28.

217. Andino A, Hanning I. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:520179.
218. Paudyal N, Pan H, Wu B, Zhou X, Zhou X, Chai W, et al. Persistent Asymptomatic Human Infections by *Salmonella enterica* Serovar Newport in China. *mSphere*. 2020 May 27;5(3):e00163-20.
219. Xu H, Zhang W, Zhang K, Zhang Y, Wang Z, Zhang W, et al. Characterization of *Salmonella* serotypes prevalent in asymptomatic people and patients. *BMC Infect Dis*. 2021 Jul 1;21:632.
220. Marzel A, Desai PT, Goren A, Schorr YI, Nissan I, Porwollik S, et al. Persistent Infections by Nontyphoidal *Salmonella* in Humans: Epidemiology and Genetics. *Clinical Infectious Diseases*. 2016 Apr 1;62(7):879–86.
221. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFS2 [Internet]. 2021 Feb [cited 2022 Apr 4];19(2). Available from: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2021.6406>
222. MacKenzie KD, Palmer MB, Köster WL, White AP. Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic *Salmonella* Strains to Colonize Multiple Host Species. *Front Vet Sci*. 2017 Aug 25;4:138.
223. Popa GL, Papa MI. *Salmonella* spp. infection - a continuous threat worldwide. *Germs*. 2021 Mar 15;11(1):88–96.
224. Van Cauteren D, De Valk H, Sommen C, King LA, Jourdan–Da Silva N, Weill FX, et al. Community Incidence of *Campylobacteriosis* and Nontyphoidal *Salmonellosis*, France, 2008–2013. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2015 Aug;12(8):664–9.
225. Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES, Conte-Junior CA. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. Björkroth J, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2019 Jul 15;85(14):e00591-19.
226. Ibarra JA, Steele-Mortimer O. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol*. 2009 Nov;11(11):1579–86.
227. Ajmera A, Shabbir N. *Salmonella*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2023 Jan 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555892/>
228. Yamaguchi T, Makino F, Miyata T, Minamino T, Kato T, Namba K. Structure of the molecular bushing of the bacterial flagellar motor. *Nat Commun*. 2021 Jul 22;12(1):4469.
229. Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J Bacteriol*. 2003 Jun;185(12):3567–74.

230. Boyd EF, Hartl DL. Analysis of the Type 1 Pilin Gene Cluster *fim* in Salmonella: Its Distinct Evolutionary Histories in the 5' and 3' Regions. *J Bacteriol.* 1999 Feb;181(4):1301–8.
231. Cheng RA, Wiedmann M. Recent Advances in Our Understanding of the Diversity and Roles of Chaperone-Usher Fimbriae in Facilitating Salmonella Host and Tissue Tropism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jan 17];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.628043>
232. Kuźmińska-Bajor M, Grzymajło K, Ugorski M. Type 1 fimbriae are important factors limiting the dissemination and colonization of mice by Salmonella Enteritidis and contribute to the induction of intestinal inflammation during Salmonella invasion. *Front Microbiol.* 2015 Apr 9;6:276.
233. Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, Abed N, Boumart Z, Chaussé AM, et al. Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis. *Microbiologyopen.* 2012 Sep;1(3):243–58.
234. Malik Kale P, Jolly C, Lathrop S, Winfree S, Luterbach C, Steele-Mortimer O. Salmonella – At Home in the Host Cell. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2011 [cited 2023 Jan 12];2. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00125>
235. Yoon H, Ansong C, Adkins JN, Heffron F. Discovery of Salmonella Virulence Factors Translocated via Outer Membrane Vesicles to Murine Macrophages ∇ . *Infect Immun.* 2011 Jun;79(6):2182–92.
236. Moest TP, Méresse S. Salmonella T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr Opin Microbiol.* 2013 Feb;16(1):38–44.
237. Zhou D, Chen LM, Hernandez L, Shears SB, Galán JE. A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol.* 2001 Jan;39(2):248–59.
238. Jiao Y, Zhang Y guo, Lin Z, Lu R, Xia Y, Meng C, et al. Salmonella Enteritidis Effector AvrA Suppresses Autophagy by Reducing Beclin-1 Protein. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020 [cited 2023 Jan 12];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00686>
239. Jones RM, Wu H, Wentworth C, Luo L, Collier-Hyams L, Neish AS. Salmonella AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. *Cell Host Microbe.* 2008 Apr 17;3(4):233–44.
240. Jennings E, Thurston TLM, Holden DW. Salmonella SPI-2 Type III Secretion System Effectors: Molecular Mechanisms And Physiological Consequences. *Cell Host & Microbe.* 2017 Aug 9;22(2):217–31.
241. Domingues L, Holden DW, Mota LJ. The Salmonella effector SteA contributes to the control of membrane dynamics of Salmonella-containing vacuoles. *Infect Immun.* 2014 Jul;82(7):2923–34.

242. Deiwick J, Salcedo SP, Boucrot E, Gilliland SM, Henry T, Petermann N, et al. The Translocated Salmonella Effector Proteins SseF and SseG Interact and Are Required To Establish an Intracellular Replication Niche. *Infect Immun*. 2006 Dec;74(12):6965–72.
243. Beuzón CR, Méresse S, Unsworth KE, Ruíz-Albert J, Garvis S, Waterman SR, et al. Salmonella maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J*. 2000 Jul 3;19(13):3235–49.
244. Ferraboschi P, Ciceri S, Grisenti P. Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Dec 14;10(12):1534.
245. Schroeder N, Henry T, de Chastellier C, Zhao W, Guilhon AA, Gorvel JP, et al. The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of Salmonella-containing vacuoles. *PLoS Pathog*. 2010 Jul 15;6(7):e1001002.
246. Knuff K, Finlay BB. What the SIF Is Happening—The Role of Intracellular Salmonella-Induced Filaments. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Jul 25;7:335.
247. Knodler LA, Steele-Mortimer O. The Salmonella Effector PipB2 Affects Late Endosome/Lysosome Distribution to Mediate Sif Extension. *Mol Biol Cell*. 2005 Sep;16(9):4108–23.
248. Drecktrah D, Levine-Wilkinson S, Dam T, Winfree S, Knodler LA, Schroer TA, et al. Dynamic Behavior of Salmonella-Induced Membrane Tubules in Epithelial Cells. *Traffic*. 2008 Dec;9(12):2117–29.
249. Mesquita FS, Thomas M, Sachse M, Santos AJM, Figueira R, Holden DW. The Salmonella deubiquitinase SseL inhibits selective autophagy of cytosolic aggregates. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002743.
250. Sun H, Kamanova J, Lara-Tejero M, Galán JE. A Family of Salmonella Type III Secretion Effector Proteins Selectively Targets the NF- κ B Signaling Pathway to Preserve Host Homeostasis. *PLOS Pathogens*. 2016 Mar 2;12(3):e1005484.
251. Mazurkiewicz P, Thomas J, Thompson JA, Liu M, Arbibe L, Sansonetti P, et al. SpvC is a Salmonella effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol*. 2008 Mar;67(6):1371–83.
252. Valenzuela C, Gil M, Urrutia ÍM, Sabag A, Enninga J, Santiviago CA. SopB- and SifA-dependent shaping of the Salmonella-containing vacuole proteome in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Cell Microbiol*. 2021 Jan;23(1):e13263.
253. Vonaesch P, Sellin ME, Cardini S, Singh V, Barthel M, Hardt WD. The Salmonella Typhimurium effector protein SopE transiently localizes to the early SCV and contributes to intracellular replication. *Cell Microbiol*. 2014 Dec;16(12):1723–35.

254. Broz P, Ohlson MB, Monack DM. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. *Gut Microbes*. 2012 Mar 1;3(2):62–70.
255. Jiang L, Wang P, Song X, Zhang H, Ma S, Wang J, et al. *Salmonella Typhimurium* reprograms macrophage metabolism via T3SS effector SopE2 to promote intracellular replication and virulence. *Nat Commun*. 2021 Feb 9;12(1):879.
256. Pullinger GD, Paulin SM, Charleston B, Watson PR, Bowen AJ, Dziva F, et al. Systemic Translocation of *Salmonella enterica* Serovar Dublin in Cattle Occurs Predominantly via Efferent Lymphatics in a Cell-Free Niche and Requires Type III Secretion System 1 (T3SS-1) but Not T3SS-2. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5191–9.
257. Ijaz A, Veldhuizen EJA, Broere F, Rutten VPMG, Jansen CA. The Interplay between *Salmonella* and Intestinal Innate Immune Cells in Chickens. *Pathogens*. 2021 Nov 19;10(11):1512.
258. Shen X, Zhang A, Gu J, Zhao R, Pan X, Dai Y, et al. Evaluating *Salmonella pullorum* dissemination and shedding patterns and antibody production in infected chickens. *BMC Vet Res*. 2022 Jun 24;18:240.
259. Dostal A, Gagnon M, Chassard C, Zimmermann MB, O'Mahony L, Lacroix C. *Salmonella* Adhesion, Invasion and Cellular Immune Responses Are Differentially Affected by Iron Concentrations in a Combined In Vitro Gut Fermentation-Cell Model. *PLoS One*. 2014 Mar 27;9(3):e93549.
260. Pires SM, Vigre H, Makela P, Hald T. Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe. *Foodborne Pathog Dis*. 2010 Nov;7(11):1351–61.
261. Gut AM, Vasiljevic T, Yeager T, Donkor ONY 2018. *Salmonella* infection – prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology*. 164(11):1327–44.
262. Medalla F, Gu W, Mahon BE, Judd M, Folster J, Griffin PM, et al. Estimated Incidence of Antimicrobial Drug-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* Infections, United States, 2004–2012. *Emerg Infect Dis*. 2017 Jan;23(1):29–37.
263. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci*. 2008 Apr;86(14 Suppl):E173-187.
264. Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs*. 2002;62(4):557–66.
265. Le Gall-David S, Zenbaa N, Bouchard D, Lavault MT, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A, et al. Hypermutator *Salmonella Heidelberg* induces an early cell death in epithelial cells. *Vet Microbiol*. 2015 Oct 22;180(1–2):65–74.
266. Virlogeux-Payant I, Baucheron S, Pelet J, Trotereau J, Bottreau E, Velge P, et al. TolC, but not AcrB, is involved in the invasiveness of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar

- Typhimurium by increasing type III secretion system-1 expression. *Int J Med Microbiol.* 2008 Oct;298(7–8):561–9.
267. Brinkac L, Voorhies A, Gomez A, Nelson KE. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microb Ecol.* 2017 Nov;74(4):1001–8.
268. Varma JK, Greene KD, Ovitt J, Barrett TJ, Medalla F, Angulo FJ. Hospitalization and Antimicrobial Resistance in Salmonella Outbreaks, 1984–2002. *Emerg Infect Dis.* 2005 Jun;11(6):943–6.
269. Allen HK, Trachsel J, Looft T, Casey TA. Finding alternatives to antibiotics. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Sep;1323:91–100.
270. Zommiti M, Feuilloley MGJ, Connil N. Update of Probiotics in Human World: A Nonstop Source of Benefactions till the End of Time. *Microorganisms.* 2020 Nov 30;8(12):1907.
271. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, et al. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutr.* 2013 Jan 2;2013:481651.
272. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb;73(2 Suppl):444S-450S.
273. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014 Jan 7;20(1):91–9.
274. Lin TL, Shu CC, Lai WF, Tzeng CM, Lai HC, Lu CC. Investiture of next generation probiotics on amelioration of diseases – Strains do matter. *Medicine in Microecology.* 2019 Dec 15;1–2:100002.
275. Walter J. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Aug;74(16):4985–96.
276. Mu Q, Tavella VJ, Luo XM. Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jan 11];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00757>
277. Han SK, Shin YJ, Lee DY, Kim KM, Yang SJ, Kim DS, et al. *Lactobacillus rhamnosus* HDB1258 modulates gut microbiota-mediated immune response in mice with or without lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. *BMC Microbiology.* 2021 May 13;21(1):146.
278. Tomusiak-Plebanek A, Mruk M, Rząca S, Strus M, Arent Z. In Vitro assessment of anti-Campylobacter activity of lactobacillus strains isolated from canine rectal swabs. *BMC Vet Res.* 2022 Mar 22;18:112.
279. Sullivan Å, Bennet R, Viitanen M, Palmgren AC, Nord CE. Influence of *Lactobacillus* F19 on Intestinal Microflora in Children and Elderly Persons and Impact on *Helicobacter pylori* Infections. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2002 Jan 1;14(1):17–21.

280. Basu S, Paul DK, Ganguly S, Chatterjee M, Chandra PK. Efficacy of high-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol*. 2009 Mar;43(3):208–13.
281. Zocco MA, Dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, et al. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006;23(11):1567–74.
282. Ringel-Kulka T, Palsson OS, Maier D, Carroll I, Galanko JA, Leyer G, et al. Probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 versus placebo for the symptoms of bloating in patients with functional bowel disorders: a double-blind study. *J Clin Gastroenterol*. 2011 Jul;45(6):518–25.
283. O’Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Front Microbiol*. 2016 Jun 15;7:925.
284. Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*. 1998 Feb;19(2):281–5.
285. Patole SK, Rao SC, Keil AD, Nathan EA, Doherty DA, Simmer KN. Benefits of *Bifidobacterium breve* M-16V Supplementation in Preterm Neonates - A Retrospective Cohort Study. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150775.
286. Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S. Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile--a preliminary study. *Int J Food Microbiol*. 2007 Jan 25;113(2):228–32.
287. Chenoll E, Rivero M, Codoñer FM, Martínez-Blanch JF, Ramón D, Genovés S, et al. Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Strain CECT 7210, a Probiotic Strain Active against Rotavirus Infections. *Genome Announc*. 2015 Apr 2;3(2):e00105-15.
288. Sekine K, Toida T, Saito M, Kuboyama M, Kawashima T, Hashimoto Y. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res*. 1985 Mar;45(3):1300–7.
289. Panpetch W, Somboonna N, Palasuk M, Hiengrach P, Finkelman M, Tumwasorn S, et al. Oral *Candida* administration in a *Clostridium difficile* mouse model worsens disease severity but is attenuated by *Bifidobacterium*. *PLoS One*. 2019 Jan 15;14(1):e0210798.
290. Engevik MA, Luk B, Chang-Graham AL, Hall A, Herrmann B, Ruan W, et al. *Bifidobacterium dentium* Fortifies the Intestinal Mucus Layer via Autophagy and Calcium Signaling Pathways. *mBio*. 2019 Jun 18;10(3):e01087-19.
291. Sun S, Luo L, Liang W, Yin Q, Guo J, Rush AM, et al. *Bifidobacterium* alters the gut microbiota and modulates the functional metabolism of T regulatory cells in the context of immune

- checkpoint blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020 Nov 3;117(44):27509–15.
292. Dore MP, Bibbò S, Fresi G, Bassotti G, Pes GM. Side Effects Associated with Probiotic Use in Adult Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*. 2019 Dec 2;11(12):2913.
293. Wang XL, Liu ZY, Li YH, Yang LY, Yin J, He JH, et al. Effects of Dietary Supplementation of *Lactobacillus delbrueckii* on Gut Microbiome and Intestinal Morphology in Weaned Piglets. *Front Vet Sci*. 2021 Aug 19;8:692389.
294. Sugimura N, Li Q, Chu ESH, Lau HCH, Fong W, Liu W, et al. *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumourigenesis. *Gut*. 2022 Oct 1;71(10):2011–21.
295. Preidis GA, Saulnier DM, Blutt SE, Mistretta TA, Riehle KP, Major AM, et al. Probiotics stimulate enterocyte migration and microbial diversity in the neonatal mouse intestine. *FASEB J*. 2012 May;26(5):1960–9.
296. Liu H, Zhang J, Zhang S, Yang F, Thacker PA, Zhang G, et al. Oral Administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 Favors Intestinal Development and Alters the Intestinal Microbiota in Formula-Fed Piglets. *J Agric Food Chem*. 2014 Jan 29;62(4):860–6.
297. Preston K, Krumian R, Hattner J, de Montigny D, Stewart M, Gaddam S. *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Benef Microbes*. 2018 Sep 18;9(5):697–706.
298. Shornikova AV, Casas IA, Mykkänen H, Salo E, Vesikari T. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J*. 1997 Dec;16(12):1103–7.
299. Matsumoto T, Ishikawa H, Tateda K, Yaeshima T, Ishibashi N, Yamaguchi K. Oral administration of *Bifidobacterium longum* prevents gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;104(3):672–80.
300. Choi YJ, Shin SH, Shin HS. Immunomodulatory Effects of *Bifidobacterium* spp. and Use of *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium longum* on Acute Diarrhea in Children. *J Microbiol Biotechnol*. 2022 Sep 28;32(9):1186–94.
301. Li SC, Hsu WF, Chang JS, Shih CK. Combination of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Shows a Stronger Anti-Inflammatory Effect than Individual Strains in HT-29 Cells. *Nutrients*. 2019 Apr 27;11(5):969.
302. Chang CJ, Lin TL, Tsai YL, Wu TR, Lai WF, Lu CC, et al. Next generation probiotics in disease amelioration. *J Food Drug Anal*. 27(3):615–22.

303. O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol*. 2017 Apr 25;2(5):1–6.
304. Zhou Y, Zhi F. Lower Level of Bacteroides in the Gut Microbiota Is Associated with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5828959.
305. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):107–18.
306. Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*. 2016 Mar;65(3):415–25.
307. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 28;105(43):16731–6.
308. Cong J, Zhou P, Zhang R. Intestinal Microbiota-Derived Short Chain Fatty Acids in Host Health and Disease. *Nutrients*. 2022 May 9;14(9):1977.
309. Sun F, Zhang Q, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. A potential species of next-generation probiotics? The dark and light sides of *Bacteroides fragilis* in health. *Food Research International*. 2019 Dec;126:108590.
310. Casterline BW, Hecht AL, Choi VM, Bubeck Wardenburg J. The *Bacteroides fragilis* pathogenicity island links virulence and strain competition. *Gut Microbes*. 2017 Feb 23;8(4):374–83.
311. Zhang W, Zhu B, Xu J, Liu Y, Qiu E, Li Z, et al. *Bacteroides fragilis* Protects Against Antibiotic-Associated Diarrhea in Rats by Modulating Intestinal Defenses. *Front Immunol*. 2018 May 9;9:1040.
312. Ramakrishna C, Kujawski M, Chu H, Li L, Mazmanian SK, Cantin EM. *Bacteroides fragilis* polysaccharide A induces IL-10 secreting B and T cells that prevent viral encephalitis. *Nat Commun*. 2019 May 14;10:2153.
313. Price CE, Valls RA, Ramsey AR, Loeven NA, Jones JT, Barrack KE, et al. Intestinal *Bacteroides* Modulates Systemic Inflammation and the Microbial Ecology in a Mouse Model of CF: Evidence for Propionate and other Short Chain Fatty Acids Reducing Systemic Inflammatory Cytokines [Internet]. *bioRxiv*; 2022 [cited 2022 Nov 10]. p. 2022.01.05.475125. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.01.05.475125v1>
314. Nie K, Ma K, Luo W, Shen Z, Yang Z, Xiao M, et al. *Roseburia intestinalis*: A Beneficial Gut Organism From the Discoveries in Genus and Species. *Frontiers in Cellular and Infection*

Microbiology [Internet]. 2021 [cited 2022 Aug 18];11. Available from:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.757718>

315. Duncan SH, Hold GL, Barcenilla A, Stewart CS, Flint HJ. Roseburia intestinalis sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 Sep;52(Pt 5):1615–20.
316. Shen Z, Zhu C, Quan Y, Yang J, Yuan W, Yang Z, et al. Insights into Roseburia intestinalis which alleviates experimental colitis pathology by inducing anti-inflammatory responses. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Oct;33(10):1751–60.
317. Luo W, Shen Z, Deng M, Li X, Tan B, Xiao M, et al. Roseburia intestinalis supernatant ameliorates colitis induced in mice by regulating the immune response. *Mol Med Rep*. 2019 Aug;20(2):1007–16.
318. Kasahara K, Krautkramer KA, Org E, Romano KA, Kerby RL, Vivas EI, et al. Interactions between Roseburia intestinalis and diet modulate atherogenesis in a murine model. *Nat Microbiol*. 2018 Dec;3(12):1461–71.
319. Zhu C, Song K, Shen Z, Quan Y, Tan B, Luo W, et al. Roseburia intestinalis inhibits interleukin-17 excretion and promotes regulatory T cells differentiation in colitis. *Mol Med Rep*. 2018 Jun;17(6):7567–74.
320. Xu F, Cheng Y, Ruan G, Fan L, Tian Y, Xiao Z, et al. New pathway ameliorating ulcerative colitis: focus on Roseburia intestinalis and the gut–brain axis. *Therap Adv Gastroenterol*. 2021 Apr 15;14:17562848211004468.
321. Cleophas MCP, Ratter JM, Bekkering S, Quintin J, Schraa K, Stroes ES, et al. Effects of oral butyrate supplementation on inflammatory potential of circulating peripheral blood mononuclear cells in healthy and obese males. *Sci Rep*. 2019 Jan 28;9(1):775.
322. Chang CC, Kao WY, Liu CY, Su HH, Kan YA, Lin PY, et al. Butyrate supplementation regulates expression of chromosome segregation 1-like protein to reverse the genetic distortion caused by p53 mutations in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2022 Apr 13;60(6):64.
323. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2016 Mar;65(3):426–36.
324. Ashrafian F, Shahriary A, Behrouzi A, Moradi HR, Keshavarz Azizi Raftar S, Lari A, et al. Akkermansia muciniphila-Derived Extracellular Vesicles as a Mucosal Delivery Vector for Amelioration of Obesity in Mice. *Front Microbiol*. 2019;10:2155.
325. Zhu L, Lu X, Liu L, Voglmeir J, Zhong X, Yu Q. Akkermansia muciniphila protects intestinal mucosa from damage caused by *S. pullorum* by initiating proliferation of intestinal epithelium. *Veterinary Research*. 2020 Mar 5;51(1):34.

326. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med*. 2019 Jul 1;25(7):1096–103.
327. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med*. 2017 Jan;23(1):107–13.
328. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*. 2015 Nov 1;64(11):1744–54.
329. Behary P, Tharakan G, Alexiadou K, Johnson N, Wewer Albrechtsen NJ, Kenkre J, et al. Combined GLP-1, Oxyntomodulin, and Peptide YY Improves Body Weight and Glycemia in Obesity and Prediabetes/Type 2 Diabetes: A Randomized, Single-Blinded, Placebo-Controlled Study. *Diabetes Care*. 2019 Aug;42(8):1446–53.
330. Nastasi C, Candela M, Bonefeld CM, Geisler C, Hansen M, Krejsgaard T, et al. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Sci Rep*. 2015 Nov 6;5:16148.
331. Alameddine J, Godefroy E, Papargyris L, Sarrabayrouse G, Tabiasco J, Bridonneau C, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* Skews Human DC to Prime IL10-Producing T Cells Through TLR2/6/JNK Signaling and IL-10, IL-27, CD39, and IDO-1 Induction. *Front Immunol*. 2019 Feb 6;10:143.
332. Breyner NM, Michon C, de Sousa CS, Vilas Boas PB, Chain F, Azevedo VA, et al. Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* Shows a Protective Effect on DNBS and DSS-Induced Colitis Model in Mice through Inhibition of NF- κ B Pathway. *Front Microbiol*. 2017;8:114.
333. Fitzgerald CB, Shkoporov AN, Sutton TDS, Chaplin AV, Velayudhan V, Ross RP, et al. Comparative analysis of *Faecalibacterium prausnitzii* genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa. *BMC Genomics*. 2018 Dec 14;19:931.
334. Auger S, Kropp C, Borrás-Nogues E, Chanput W, Andre-Leroux G, Gitton-Quent O, et al. Intraspecific Diversity of Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii*. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 1;23(3):1705.
335. Savin KW, Zawadzki J, Auldish MJ, Wang J, Ram D, Rochfort S, et al. *Faecalibacterium* diversity in dairy cow milk. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221055.
336. Maioli TU, Borrás-Nogues E, Torres L, Barbosa SC, Martins VD, Langella P, et al. Possible Benefits of *Faecalibacterium prausnitzii* for Obesity-Associated Gut Disorders. *Front Pharmacol*. 2021 Dec 2;12:740636.

337. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol*. 2015;28(2):203–9.
338. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*. 2011 Aug;141(2):599–609, 609.e1-3.
339. Bosi A, Banfi D, Bistoletti M, Giaroni C, Baj A. Tryptophan Metabolites Along the Microbiota-Gut-Brain Axis: An Interkingdom Communication System Influencing the Gut in Health and Disease. *Int J Tryptophan Res*. 2020 Jun 11;13:1178646920928984.
340. Breton J, Legrand R, Akkermann K, Järv A, Harro J, Déchelotte P, et al. Elevated plasma concentrations of bacterial ClpB protein in patients with eating disorders. *Int J Eat Disord*. 2016 Aug;49(8):805–8.
341. Wang Q, Luo Y, Ray Chaudhuri K, Reynolds R, Tan EK, Pettersson S. The role of gut dysbiosis in Parkinson’s disease: mechanistic insights and therapeutic options. *Brain*. 2021 Oct 22;144(9):2571–93.
342. Huang Y, Liao J, Liu X, Zhong Y, Cai X, Long L. Review: The Role of Intestinal Dysbiosis in Parkinson’s Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 19];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.615075>
343. Liu S, Gao J, Zhu M, Liu K, Zhang HL. Gut Microbiota and Dysbiosis in Alzheimer’s Disease: Implications for Pathogenesis and Treatment. *Mol Neurobiol*. 2020 Dec;57(12):5026–43.
344. Janeiro MH, Ramírez MJ, Solas M. Dysbiosis and Alzheimer’s Disease: Cause or Treatment Opportunity? *Cell Mol Neurobiol*. 2022 Mar;42(2):377–87.
345. Madan JC, Koestler DC, Stanton BA, Davidson L, Moulton LA, Housman ML, et al. Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *mBio*. 2012;3(4):e00251-12.
346. Zhang D, Li S, Wang N, Tan HY, Zhang Z, Feng Y. The Cross-Talk Between Gut Microbiota and Lungs in Common Lung Diseases. *Front Microbiol*. 2020;11:301.
347. Vaughan A, Frazer ZA, Hansbro PM, Yang IA. COPD and the gut-lung axis: the therapeutic potential of fibre. *J Thorac Dis*. 2019 Oct;11(Suppl 17):S2173–80.
348. Hufnagl K, Pali-Schöll I, Roth-Walter F, Jensen-Jarolim E. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Semin Immunopathol*. 2020 Feb;42(1):75–93.
349. Fujimura KE, Sitarik AR, Havstad S, Lin DL, Levan S, Fadrosch D, et al. Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nat Med*. 2016 Oct;22(10):1187–91.

350. Gautier T, David-Le Gall S, Sweidan A, Tamanai-Shacoori Z, Jolivet-Gougeon A, Loréal O, et al. Next-Generation Probiotics and Their Metabolites in COVID-19. *Microorganisms*. 2021 Apr 27;9(5):941.
351. Su Q, Lau RI, Liu Q, Chan FKL, Ng SC. Post-acute COVID-19 syndrome and gut dysbiosis linger beyond 1 year after SARS-CoV-2 clearance. *Gut* [Internet]. 2022 Aug 8 [cited 2022 Dec 9]; Available from: <https://gut.bmj.com/content/early/2022/10/04/gutjnl-2022-328319>
352. Xu R, Lu R, Zhang T, Wu Q, Cai W, Han X, et al. Temporal association between human upper respiratory and gut bacterial microbiomes during the course of COVID-19 in adults. *Commun Biol*. 2021 Feb 18;4(1):1–11.
353. Lloréns-Rico V, Gregory AC, Van Weyenbergh J, Jansen S, Van Buyten T, Qian J, et al. Clinical practices underlie COVID-19 patient respiratory microbiome composition and its interactions with the host. *Nat Commun*. 2021 Oct 29;12(1):6243.
354. Hoque MN, Sarkar MMH, Rahman MS, Akter S, Banu TA, Goswami B, et al. SARS-CoV-2 infection reduces human nasopharyngeal commensal microbiome with inclusion of pathobionts. *Sci Rep*. 2021 Dec 15;11(1):24042.
355. Yeoh YK, Zuo T, Lui GCY, Zhang F, Liu Q, Li AY, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*. 2021 Apr;70(4):698–706.
356. Biliński J, Winter K, Jasiński M, Szczęś A, Bilinska N, Mullish BH, et al. Rapid resolution of COVID-19 after faecal microbiota transplantation. *Gut*. 2022 Jan;71(1):230–2.
357. Liu T, Liang W, Zhong H, He J, Chen Z, He G, et al. Risk factors associated with COVID-19 infection: a retrospective cohort study based on contacts tracing. *Emerg Microbes Infect*. 9(1):1546–53.
358. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota. *Nat Immunol*. 2013 Jul;14(7):685–90.
359. Abt MC, Pamer EG. Commensal bacteria mediated defenses against pathogens. *Curr Opin Immunol*. 2014 Aug;0:16–22.
360. Simons A, Alhanout K, Duval RE. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*. 2020 Apr 27;8(5):639.
361. Joerger MC, Klaenhammer TR. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol*. 1986 Aug;167(2):439–46.
362. Vaughan EE, Daly C, Fitzgerald GF. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J Appl Bacteriol*. 1992 Oct;73(4):299–308.

363. Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*. 2002;84(5–6):499–510.
364. Powell DA, Roberts LM, Ledvina HE, Sempowski GD, Curtiss R, Frelinger JA. Distinct Innate Responses are Induced by Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Mutants. *Cell Immunol*. 2016 Jan;299:42–9.
365. J Leukocyte Bio - 2005 - Pietil - Activation cytokine production and intracellular survival of bacteria in (1).pdf.
366. MIZUNO Y, TAKADA H, NOMURA A, JIN CH, HATTORI H, IHARA K, et al. Th1 and Th1-inducing cytokines in *Salmonella* infection. *Clin Exp Immunol*. 2003 Jan;131(1):111–7.
367. De Silva A, Bloom SR. Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity. *Gut Liver*. 2012 Jan;6(1):10–20.
368. Cui T, Ren Y, Ma H, Liu SF, Zhang XX, Yu H ling. [The changes of gastrointestinal hormones GLP-1, PYY and ghrelin in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2013 Sep;44(5):774–8.
369. Cho HJ, Robinson ES, Rivera LR, McMillan PJ, Testro A, Nikfarjam M, et al. Glucagon-like peptide 1 and peptide YY are in separate storage organelles in enteroendocrine cells. *Cell Tissue Res*. 2014 Jul;357(1):63–9.
370. Larraufie P, Martin-Gallausiaux C, Lapaque N, Dore J, Gribble FM, Reimann F, et al. SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. *Sci Rep*. 2018 Jan 8;8(1):74.
371. Gautier T, Oliviero N, Ferron S, Le Pogam P, David-Le Gall S, Sauvager A, et al. *Bacteroides fragilis* derived metabolites, identified by molecular networking, decrease *Salmonella* virulence in mice model. *Front Microbiol*. 2022 Nov 10;13:1023315.
372. Song Z, Cai Y, Lao X, Wang X, Lin X, Cui Y, et al. Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome*. 2019 Jan 23;7(1):9.
373. Yao L, Seaton SC, Ndousse-Fetter S, Adhikari AA, DiBenedetto N, Mina AI, et al. A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism. Turnbaugh P, Garrett WS, editors. *eLife*. 2018 Jul 17;7:e37182.
374. Soler-García ÁA, De Jesús AJ, Taylor K, Brown EW. Differentiation of *Salmonella* strains from the SARA, SARB and SARC reference collections by using three genes PCR-RFLP and the 2100 Agilent Bioanalyzer. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2014 [cited 2022 Nov 29];5. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00417>
375. Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. Type III Secretion Systems and Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Oct;20(4):535–49.

376. Gautier T, Fahet N, Tamanai-Shacoori Z, Oliviero N, Blot M, Sauvager A, et al. Roseburia intestinalis Modulates PYY Expression in a New a Multicellular Model including Enteroendocrine Cells. *Microorganisms*. 2022 Nov 15;10(11):2263.
377. Dona AC, Kyriakides M, Scott F, Shephard EA, Varshavi D, Veselkov K, et al. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2016 Jan 1;14:135–53.
378. Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, et al. Assessment of analytical reproducibility of ¹H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem*. 2006 Apr 1;78(7):2199–208.
379. Tintaru A, Ungaro R, Liu X, Chen C, Giordano L, Peng L, et al. Structural characterization of new defective molecules in poly(amidoamide) dendrimers by combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Anal Chim Acta*. 2015 Jan 1;853:451–9.
380. Jiminez JA, Uwiera TC, Abbott DW, Uwiera RRE, Inglis GD. Butyrate Supplementation at High Concentrations Alters Enteric Bacterial Communities and Reduces Intestinal Inflammation in Mice Infected with *Citrobacter rodentium*. *mSphere*. 2017 Aug 23;2(4):e00243-17.
381. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis GA, Vogiatzi G, Papaioannou S, et al. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol*. 2019 Apr;14(1):50–9.
382. Nighot M, Al-Sadi R, Guo S, Rawat M, Nighot P, Watterson MD, et al. Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Permeability Is Mediated by Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Activation of Myosin Light Chain Kinase Expression. *Am J Pathol*. 2017 Dec;187(12):2698–710.
383. Guo S, Nighot M, Al-Sadi R, Alhmoud T, Nighot P, Ma TY. Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. *J Immunol*. 2015 Nov 15;195(10):4999–5010.
384. Kho ZY, Lal SK. The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2018 [cited 2022 Nov 25];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01835>
385. Das P, Ji B, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F, Nielsen J. In vitro co-cultures of human gut bacterial species as predicted from co-occurrence network analysis. *PLoS One*. 2018 Mar 30;13(3):e0195161.
386. Touch S, Godefroy E, Rolhion N, Danne C, Oeuvray C, Straube M, et al. Human CD4+CD8α+ Tregs induced by Faecalibacterium prausnitzii protect against intestinal inflammation. *JCI Insight*. 2022 Jun 22;7(12):e154722.
387. Kong S, Zhang YH, Zhang W. Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *Biomed Res Int*. 2018 May 9;2018:2819154.

388. Wang J, Chen WD, Wang YD. The Relationship Between Gut Microbiota and Inflammatory Diseases: The Role of Macrophages. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020 [cited 2022 Dec 7];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01065>
389. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*. 2007 Jan;56(1):45–50.
390. Varani J, McClintock SD, Aslam MN. Organoid culture to study epithelial cell differentiation and barrier formation in the colon: bridging the gap between monolayer cell culture and human subject research. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2021 Feb;57(2):174–90.
391. Chneiweiss H. Organoïdes : nouvelles perspectives et nouvelles questions éthiques. *Med Sci (Paris)*. 2020 Feb 1;36(2):99–100.
392. Altay G, Larrañaga E, Tosi S, Barriga FM, Batlle E, Fernández-Majada V, et al. Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function. *Sci Rep*. 2019 Jul 12;9:10140.
393. Jalili-Firoozinezhad S, Gazzaniga FS, Calamari EL, Camacho DM, Fadel CW, Bein A, et al. A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip. *Nat Biomed Eng*. 2019 Jul;3(7):520–31.
394. Leung CM, de Haan P, Ronaldson-Bouchard K, Kim GA, Ko J, Rho HS, et al. A guide to the organ-on-a-chip. *Nat Rev Methods Primers*. 2022 May 12;2(1):1–29.
395. Thavamani A, Salem I, Sferra TJ, Sankararaman S. Impact of Altered Gut Microbiota and Its Metabolites in Cystic Fibrosis. *Metabolites*. 2021 Feb 22;11(2):123.
396. Valley HC, Bukis KM, Bell A, Cheng Y, Wong E, Jordan NJ, et al. Isogenic cell models of cystic fibrosis-causing variants in natively expressing pulmonary epithelial cells. *J Cyst Fibros*. 2019 Jul;18(4):476–83.
397. Tsuei J, Chau T, Mills D, Wan YJY. Bile acid dysregulation, gut dysbiosis, and gastrointestinal cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014 Nov;239(11):1489–504.
398. Lee G, You HJ, Bajaj JS, Joo SK, Yu J, Park S, et al. Distinct signatures of gut microbiome and metabolites associated with significant fibrosis in non-obese NAFLD. *Nat Commun*. 2020 Oct 5;11(1):4982.
399. Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab*. 2017 May 2;25(5):1054-1062.e5.
400. McGill MR, Yan HM, Ramachandran A, Murray GJ, Rollins DE, Jaeschke H. HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2011 Mar;53(3):974–82.

401. Tong ZB, Hogberg H, Kuo D, Sakamuru S, Xia M, Smirnova L, et al. Characterization of three human cell line models for high-throughput neuronal cytotoxicity screening. *J Appl Toxicol*. 2017 Feb;37(2):167–80.
402. Czepiel J, Drózdź M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W, Mielimonka A, et al. Clostridium difficile infection: review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(7):1211–21.
403. Wang JW, Kuo CH, Kuo FC, Wang YK, Hsu WH, Yu FJ, et al. Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J Formos Med Assoc*. 2019 Mar;118 Suppl 1:S23–31.
404. Alves-Santos AM, Sugizaki CSA, Lima GC, Naves MMV. Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review. *Journal of Functional Foods*. 2020 Nov 1;74:104169.

Titre : Caractérisation de deux bactéries commensales intestinales :

Bacteroides fragilis et *Roseburia intestinalis*

Mots clés : microbiote, métabolites, *Bacteroides*, acide cholique, *Roseburia*, PYY

Résumé : L'épithélium intestinal et le microbiote intestinal sont en équilibre dans l'intestin. Cependant, cet équilibre peut être rompu par différents facteurs endogènes ou exogènes, conduisant à la dysbiose intestinale. La dysbiose intestinale est une perturbation de la composition du microbiote intestinal, pouvant être corrélée à l'apparition de certaines pathologies intestinales, telles que la maladie de Crohn, l'obésité, le diabète de type 2 ou le cancer colorectal. Certaines bactéries comme *Salmonella* sont augmentées et persistent dans l'intestin tandis que d'autres espèces bactériennes commensales sont diminuées, telles que *Bacteroides fragilis* et *Roseburia intestinalis*, considérées comme des potentiels probiotiques de nouvelle génération.

Ces potentiels probiotiques de nouvelle génération sont capables de produire des métabolites bactériens exerçant des effets bénéfiques dans l'intestin et d'autres organes.

les métabolites, comprenant l'acide cholique, sécrétés par *B. fragilis* étaient capables d'inhiber la virulence de *Salmonella* Heidelberg dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Dans un deuxième temps, nous avons observé que *R. intestinalis* produisait des métabolites capables de stimuler l'expression de PYY, peptide hormonal, sur un modèle multi-cellulaire comprenant des cellules entéro-endocrines. Ces deux études montrent l'importance des métabolites produits par le microbiote intestinal, pour le maintien de l'intégrité intestinal. L'administration des probiotiques de nouvelle génération et/ou de leurs métabolites pourraient conduire à la mise en place de nouveaux traitements, dans les cas de pathologies associées aux dysbioses. Cependant, de nombreux mécanismes sont encore à élucider, notamment l'étude des communautés bactériennes et les études cliniques qui sont en cours d'élaboration.

Title : Characterization of two commensal intestinal bacteria:

Bacteroides fragilis and *Roseburia intestinalis*

Keywords : microbiota, metabolites, *Bacteroides*, cholic acid, *Roseburia*, PYY

Abstract : The intestinal epithelium and the intestinal microbiota are in balance in the intestine. However, this balance can be disrupted by various endogenous or exogenous factors, leading to intestinal dysbiosis. Intestinal dysbiosis is a disturbance of the composition of the intestinal microbiota, which can be correlated to the onset of certain intestinal pathologies, such as Crohn's disease, obesity, type 2 diabetes or colorectal cancer. Some bacteria such as *Salmonella* are increased and persist in the intestine while other commensal bacterial species are decreased, such as *Bacteroides fragilis* and *Roseburia intestinalis*, which are considered to be potential next generation probiotics.

These potential next generation probiotics are able to produce bacterial metabolites with beneficial effects in the gut and other organs.

First, we showed that the metabolites, including cholic acid, secreted by *B. fragilis* were able to inhibit the virulence of *Salmonella* Heidelberg on *in vitro* and *in vivo* models. In a second step, we observed that *R. intestinalis* produced metabolites is able to stimulated the expression of PYY, a hormonal peptide, in a multi-cellular model including enteroendocrine cells. These two studies show the importance of the metabolites produced by microbiota, for the maintenance of the intestinal integrity. The administration of next generation probiotics and/or their metabolites could lead to the implementation of new treatments for pathologies associated with dysbiosis. However, many mechanisms are still to be elucidated, including the study of bacterial communities and clinical studies.